



Etude de l'ATPase cuivre eucaryote Ccc2 de Saccharomyces cerevisiae De la localisation à la fonction

Simon Gudin

► To cite this version:

Simon Gudin. Etude de l'ATPase cuivre eucaryote Ccc2 de Saccharomyces cerevisiae De la localisation à la fonction. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00358960

HAL Id: tel-00358960

<https://theses.hal.science/tel-00358960>

Submitted on 5 Feb 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier-GRENOBLE1

UFR de BIOLOGIE

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire

Présenté et soutenu publiquement

par

Simon GUDIN

Le 13 Novembre 2008

Titre :

**Etude de l'ATPase cuivre eucaryote Ccc2 de
Saccharomyces cerevisiae**

De la localisation à la fonction

Directrice de thèse :

Dr. Elisabeth MINTZ

Jury :

Président : Pr. Michel Robert-Nicoud

Rapporteur : Dr. Rosine Haguenauer-Tsapsis

Rapporteur : Pr. Bruno André

Examineur : Dr. Harry De Koning

Examineur : Dr. Jean Labarre

Examineur : Dr. Elisabeth Mintz

*“With Magic, you can turn a frog into a prince.
With science, you can turn a frog into a Ph.D
And you still have the frog you started with”
Terry Pratchett*

Remerciements

Thèse, Canyon, même combat ! Un travail d'équipe où il faut pouvoir compter sur toutes les parties, une bonne maîtrise des techniques est indispensable pour s'en sortir, la sortie c'est droit devant, mais on ne la voit pas avant d'y être. Enfin comme un canyon, une thèse est une aventure de tous les instants où on fait le plein d'expériences. La sortie en vue, il est temps de remercier les participants.

A tout seigneur, tout honneur, je voudrais d'abord remercier les concepteurs initiaux du projet, je veux parler de mes parents bien sûr. Comme tous les enfants, j'ai souvent eu envie d'intenter un procès contre eux pour malfaçon, mais comme me l'a fait un jour remarquer ma mère, il y a prescription... Merci Maman... Enfin je dois bien admettre que je vous dois beaucoup. Merci aussi à mon frère pour son indéfectible soutien.

Je suis particulièrement reconnaissant au Pr Michel Robert Nicoud d'avoir accepté la présidence de mon Jury de thèse, mais aussi de m'avoir supporté à l'école doctorale. Je remercie sincèrement Mme Rosine Haguenauer-Tsapis et M. Bruno André qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Enfin je voudrais remercier M. Jean Labarre et M. Harry De Koning d'avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je souhaite remercier Florent, puis M. Marc Fontecave de m'avoir accueilli dans leur laboratoire au fil de ses évolutions.

Merci Ely, merci de m'avoir encadré pendant ces 3 ans, d'avoir su me faire prendre les bonnes directions, Merci d'avoir été aussi compréhensive avec toutes mes activités extra-doctorales ! Et merci de m'avoir apporté ton aide précieuse au cours de la rédaction.

Ma coupe de cheveux ayant résisté à tes assauts, Martine, je peux te remercier sans arrière-pensée ! Merci pour ta bonne humeur, ton assistance de tous les instants qui m'ont permis de faire tant de choses pendant ma thèse.

Pour avoir travaillé avec moi sur ce sujet, ils mériteront un jour une décoration pour service rendu ! Je veux parler de mes stagiaires Fabien et Charline. Merci d'avoir été patient avec moi. A bientôt en montagne !

Je ne peux évidemment pas manquer de remercier l'équipe ATPase, devenue TRIM, Merci à Pat pour sa connaissance sans faille des levures et sa disponibilité pour écouter mes problèmes scientifiques ! A Roger et sa gluthanomaniaque, Julien et son amour des gens, Sylvia malgré tes origines, Naima que j'intégrerais bien à l'équipe et qui a toujours répondu présente à tous mes appels et qui a trouvé tant de solutions à tant de mes problèmes et tout ça toujours dans la bonne humeur !

L'histoire commence il y a 6 ans, une fin d'été automnale dans un amphi poussiéreux de Nancy. Pour certains c'était le grand nord, pour d'autres c'était un peu plat, et pour le dernier c'était vraiment loin ! De prime abord ça ne fait pas un bon début pour une belle histoire, mais je ne pense pas me tromper en disant qu'aucun de nous ne regrette la suite de l'histoire ! Merci au grand cru 2002 – 2005 du magistère de Nancy, avec dans les Rôles phare, Marc, le petit animateur tombeur de ces dames, Vincent le grand brun ténébreux, Matthew l'anglais du sud de la France et Laure la femme fatale. Bientôt sur vos écrans, des suites déjà en préparation !

N'oublions surtout pas ceux qui ont occupé beaucoup de mes journées et de mes nuits, je veux parler des membres de 38 Globule, AITAP et Biodocs, trop nombreux pour tous être nommés, mais quand même, Merci Dame Béa de m'avoir initié, Karine pour notre fructueux partenariat à la tête respective de nos associations, Dalil et Marion pour avoir repris le flambeau et bien sur Laure, Jackie et Sébastien pour m'avoir soutenu pendant cette folle présidence ...

Enfin Merci à tous ceux que j'ai oubliés et que j'ai croisés au cours de ces 3 ans !

Sommaire

Sommaire	7
Introduction Bibliographique	11
1. Le cuivre	11
1.1. Un peu d'histoire	11
1.2. Pollution liée au cuivre	12
1.3. Les propriétés physico-chimiques du cuivre	13
1.4. L'importance du cuivre en biologie	14
2. L'homéostasie du cuivre	20
2.1. Le métabolisme du cuivre chez l'Homme	20
2.2. L'homéostasie du cuivre chez la levure de boulanger <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
3. Les ATPases de type P	37
3.1. Propriétés générales	38
3.2. Structure des ATPases de type P	40
3.3. Cycle catalytique des ATPases de type P	42
3.4. Classification des ATPases de type P	43
4. Les ATPases à cuivre	46
4.1. Tour d'horizon des ATPases à cuivre	47
4.2. Le site de transport intra-membranaire du cuivre	48
4.3. Le domaine N-terminal	49
4.4. Le domaine nucléotidique de la grande boucle cytoplasmique.	56
4.5. L'ATPase à cuivre de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ccc2	58
5. Localisation et trafic intracellulaire des ATPases à cuivre humaines, ATP7A et ATP7B	61
5.1. Distribution des ATPases humaines dans les tissus de l'organisme	61
5.2. Localisation intracellulaire	62
5.3. Les signaux de régulation de la localisation intracellulaire des ATPases à cuivre humaines.	65
5.4. La machinerie protéique impliquée dans le trafic des ATPases à cuivre humaines.	68
Objectifs	71
Résultats	73
1. De la localisation à la fonction	73
1.1. Etude de la localisation de l'ATPase eucaryote Ccc2	73
1.2. Etude du rôle de Ccc2 à la membrane de la vacuole.	94
1.3. Discussion	108
2. En route vers le site de transport intra-membranaire.	122
2.1. Etude du domaine Nucléotidique de la Grande Boucle de Ccc2.	123
2.2. Etude du motif ⁶⁷⁰ HP/ ⁶⁸⁰ CxxxxC	130
2.3. Etude des cystéines C708S et C718S	134
2.4. Localisation du site de liaison du cuivre sur un modèle de la GBN de Ccc2	136
2.5. Impact des mutations dans le domaine nucléotidique sur la fonctionnalité de Ccc2.	139
2.5. Discussion	141
Matériels et Méthodes	146
1. Souches et milieux de culture	146
1.1. Souches et milieux de culture bactériens	146
1.2. Souches et milieux de culture de levure	146
2. Biologie Moléculaire	147

2.1. Clonage et mutagenèse	147
2.2. Purification d'ADN sur gel d'agarose	148
2.3. Purification d'ADN plasmidique	149
2.4. Extraction d'ADN génomique de levure	149
2.5. Vecteur plasmidique	150
3. Biologie cellulaire	153
3.1. Transformation de levure	153
3.2. Caractérisation phénotypique sur milieu gélosé	153
3.3. Modification génétique de la souche BY4741	154
3.4. Localisation de Ccc2 en microscopie de fluorescence	155
3.5. Dosage du cuivre	156
4. Biochimie	157
4.1. Production et purification de protéines recombinantes	157
4.2. Dosage des protéines	158
4.3. Extraction des protéines totales de levure	158
4.4. Séparation des organites sur gradient de sucrose	159
4.5. Préparation de vacuoles de levures entières	159
4.6. Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	160
4.7. Immunodétection des protéines	161
5. Spectrométrie	161
5.1. Détection de la fixation du cuivre sur les groupements thiolates	161
5.2. Dichroïsme circulaire	162
Perspectives	164
Annexes	165
Abréviations	166
Références	168

*« Il ne saurait y avoir de vérité première. Il n'y a que des erreurs premières »
Gaston Bachelard*

Introduction Bibliographique

1. Le cuivre

La grande réactivité des métaux de transition en fait des partenaires indispensables au fonctionnement des cellules. Ainsi les ions métalliques sont-ils des éléments essentiels à la vie et participent-ils à un grand nombre de réactions métaboliques comme le stockage de l'oxygène (hémoglobine, hémocyanine), la structure des protéines (protéines en doigt de zinc, centres fer-soufre ...)... Mais telle la divinité Janus, leur réactivité les rend potentiellement extrêmement dangereux pour la cellule en cas de déséquilibre de leur homéostasie.

Parmi les métaux de transition, le cuivre est un métal important en biologie qui participe à de nombreuses réactions cellulaires essentielles telles que la respiration, la protection contre le stress oxydant... Après un bref rappel historique, je m'attèlerai dans ce chapitre à présenter les grandes propriétés du cuivre et les problèmes posés à l'environnement par l'utilisation humaine de ce métal.

1.1. Un peu d'histoire

L'âge du cuivre ou chalcolithique est une période charnière entre la fin du néolithique et le début de l'âge de bronze. C'est une période de transition qui a vu la mise en place de l'industrie métallurgique.

D'après les fouilles archéologiques, les premières traces d'utilisation du cuivre par l'homme datent d'il y a environ 10000 ans dans la région de l'actuel Iraq. Le cuivre est l'un des rares métaux qui peut se trouver sous forme métallique dans la nature. Il est facilement malléable par des techniques de martelage et son point de fusion à 1084°C, relativement bas, facilite son extraction. Toutes ces qualités peuvent expliquer le développement de l'industrie du bronze à grande échelle plutôt que celle d'autres métaux plus délicats à manipuler.

En Europe et autour de la Méditerranée, l'âge du bronze (2500 – 700 avant J-C) est marqué par le développement de l'industrie et a probablement contribué au développement de l'artisanat, à l'extension et à l'exploitation des surfaces cultivables en facilitant la déforestation (haches, outils ...), à la hiérarchisation des sociétés et au développement des

échanges économiques. En effet, le cuivre, comme tous les métaux et au contraire d'autres matériaux, peut facilement être thésaurisé, échangé ou recyclé, ce qui en fait un étalon de valeur idéal.

Cependant, ce développement n'est pas neutre pour l'environnement et la santé humaine. Cet âge marque ainsi les premières pollutions humaines à grande échelle, avec notamment les contaminations de l'eau, de l'air et de la terre par le cuivre, le plomb ou le cadmium issus des mines et des fourneaux d'extraction.

1.2. Pollution liée au cuivre

Le cuivre est naturellement présent sous la forme de trace dans l'environnement (table I.1.1)

Milieu	Concentration
Air	< 10 ng/m ³
Eau douce	1 à 10 µg/L
Eau de mer	< 0,25 µg/L
Sols	10 à 40 mg/kg
Sédiments	< 50 mg/kg

Table I.1.1 : Concentration ubiquitaire de cuivre (d'après le rapport de l'INERIS Février 2005)

A l'heure actuelle le cuivre est un métal utilisé pour de nombreuses applications. Outre ses applications bien connues dans les domaines de l'électricité et de la transmission des données, nous pouvons citer son utilisation dans l'industrie chimique comme catalyseur, dans le textile et la peinture comme mordant ou pigment, ou encore dans l'agriculture comme fongicide, bactéricide et insecticide. La consommation mondiale de cuivre a dépassé les 17 milliards de tonnes en 2006 (<http://www.icsg.org>). L'utilisation intensive est source de pollution et le cuivre n'échappe pas à cette règle. Ainsi les principales sources de pollution anthropique par le cuivre sont :

- l'industrie du cuivre et des métaux avec notamment la pollution des zones minières et des usines de raffinage ;
- l'incinération des ordures ménagères et les boues d'épuration qui concentrent le cuivre au-delà des concentrations toxiques ;
- l'agriculture avec le problème bien connu du traitement des vignobles, mais aussi de l'épandage du lisier de porc en Bretagne qui accroissent la teneur des sols en cuivre et

en zinc. Ces deux cas sont emblématiques des problèmes de contamination par le cuivre des sols dédiés à l'agriculture par leur ampleur et leur impact. En effet l'IFEN (Institut Français de l'ENvironnement) estime que d'ici quelques dizaines d'années, plus d'un million d'hectares de vignobles anciens seront impropres à la culture en raison d'une concentration en cuivre trop élevée dans le sol.

1.3. Les propriétés physico-chimiques du cuivre

1.3.1. Le cuivre métallique

Le cuivre est un métal dit lourd car sa densité est supérieure à 5 g.cm^{-3} (table I.1.2). Sous sa forme native, il se présente comme un métal rougeâtre. Il est avec l'or, le seul métal de transition à posséder une couleur qui lui est propre.

		Atomique		Physique	
Symbole	Cu	Masse atomique	63,546	Masse volumique	8920 kg/m^3
Numéro	29	Configuration électronique	[Ar] $3d^{10} 4s^1$	T° fusion	1357,6 K
Couleur	Cuivré	Structure cristalline	Cubique face centrée	T° vaporisation	2840 K

Table I.1.2 : Propriétés générales de l'élément cuivre

Le cuivre présente des orbitales électroniques incomplètes, ce qui en fait un métal de transition. Comme tous ces métaux, il est un excellent conducteur thermique et électrique. Ainsi, le cuivre sert de standard à la mesure de la conductibilité électrique. Sa valeur est arbitrairement fixée à 100 % IACS (International Annealed Copper Standard). Parmi les métaux, seul l'argent avec une valeur de 106 % possède une conductivité supérieure au cuivre. Sous sa forme métallique, le cuivre s'oxyde au contact de l'oxygène de l'air, mais contrairement au fer qui rouille jusqu'au cœur du fait de l'humidité contenue dans l'air ambiant, le cuivre n'est pas réactif à l'eau et son oxydation entraîne la formation d'une couche d'oxyde de cuivre protectrice de couleur « vert de gris ». La statue de la Liberté en est sûrement l'exemple le plus notable !

1.3.2. Cuivre et réactivité chimique

En solution, le cuivre forme majoritairement des ions cuivreux Cu(I) et cuivrique Cu(II).

Les propriétés d'oxydoréduction du cuivre sont fortement liées à la distribution de ses électrons sur ses orbitales électroniques. Sous forme métallique, les électrons du cuivre se répartissent suivant la formule $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^1$. L'ion cuivreux (Cu(I)) est obtenu par la perte d'un électron de la couche 3d et l'ion cuivrique (Cu(II)) est obtenu par la perte d'un second électron disposé sur la couche la plus externe 4s. Cette répartition électronique fait de l'ion cuivreux un très bon donneur d'électron, très largement exploité dans les réactions enzymatiques où un donneur d'électron est nécessaire.

Les ions cuivre sont peu chargés, relativement volumineux avec un gros nuage électronique, fortement polarisable. Selon la théorie HSAB (Hard and Soft Acid Base) (Pearson 1963) le cuivre est un acide mou de Lewis. La structure lacunaire de ses orbitales électroniques et leur polarisabilité permettent au cuivre de former facilement des liaisons de coordination avec des bases molles telles que les thiolates ou les groupements imidazolium, bases molles très courantes dans les molécules biologiques.

1.4. L'importance du cuivre en biologie

La coloration bleue des protéines à cuivre a très tôt attiré l'attention des biochimistes. Ainsi le biochimiste français Bertrand est probablement (et sans le savoir) le premier à avoir isolé une telle protéine au milieu des années 1890. Ce n'est qu'en 1940 que Keilin et Mann montrent qu'il s'agissait d'une enzyme à cuivre (Keilin et Mann 1940).

L'utilisation du cuivre par le vivant est étroitement liée à ses propriétés d'oxydo-réduction et à sa capacité à former des liaisons de coordination stables avec les groupements thiolate et imidazolium qui permettent son insertion dans les protéines (Gray et coll. 2000). Les rôles biologiques du cuivre sont nombreux, incluant des fonctions de transfert d'électrons comme dans le cas de la cytochrome C oxydase, le transport de l'oxygène dans celui des hémocyanines ou encore de l'oxydation de substrat dans le cas des laccases (Linder et coll. 1998).

Néanmoins, sa grande réactivité, qui fait du cuivre un partenaire privilégié des réactions enzymatiques, est également un danger majeur pour la cellule. Le cuivre est donc un

oligoélément dont la concentration est finement régulée par la cellule. Dans cette partie, je m'attacherai à présenter les sites actifs des enzymes utilisant le cuivre comme cofacteur, puis les protéines et peptides liant le cuivre intracellulaire avant d'en présenter la toxicité dans les systèmes biologiques.

1.4.1. Les protéines à cuivre

L'utilisation du cuivre comme cofacteur est liée au potentiel d'oxydoréduction du couple Cu(I)/Cu(II). Sous sa forme inorganique son potentiel est de +150 mV. Dans les protéines, l'environnement du cuivre peut considérablement modifier son potentiel d'oxydoréduction. Les cuprédoxines possèdent par exemple des potentiels compris entre +180 et +680 mV et, dans le cas de la céruloplasmine, le potentiel peut atteindre +1000 mV (Machonkin et coll. 1998).

Les sites à cuivre de ces protéines sont classés d'après leurs propriétés spectroscopiques en trois grandes familles. Sont ainsi distingués les centres de types 1, 2 et 3. Comme le montre la figure I.1.1, une même protéine peut comporter un ou plusieurs centres de types différents.

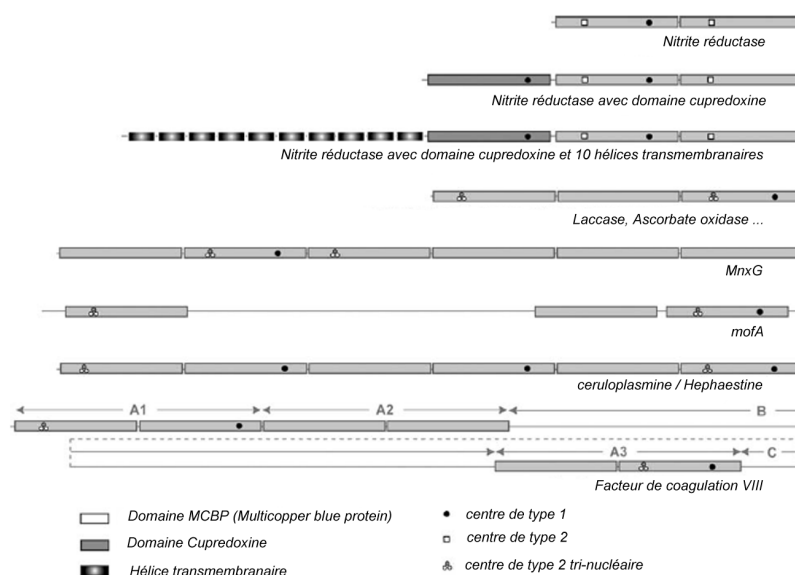


Figure I.1.1 : Représentation schématique de protéines à cuivre (d'après (Nakamura et Go 2005))

○ Les centres de type 1 :

Les centres de type 1 se caractérisent par une bande d'absorbance proche de 600 nm et par un signal fort en spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). Le motif de coordination de ces centres est toujours constitué d'une cystéine et de deux histidines proches

dans la structure primaire de la protéine, mais sans séquence consensus précise (Sakurai et Kataoka 2007). La géométrie du centre est trigonale plane quand le cuivre n'est coordonné que par ces résidus (figure I.1.2). Mais elle peut être tétraédrique lorsqu'une méthionine ou la glutamine intervient dans la coordination. Les protéines à centre de type 1 présentent souvent une coloration du bleu au vert sous leur forme oxydée, coloration due au transfert de charge entre le soufre de la cystéine et le cuivre (Solomon et coll. 1976).

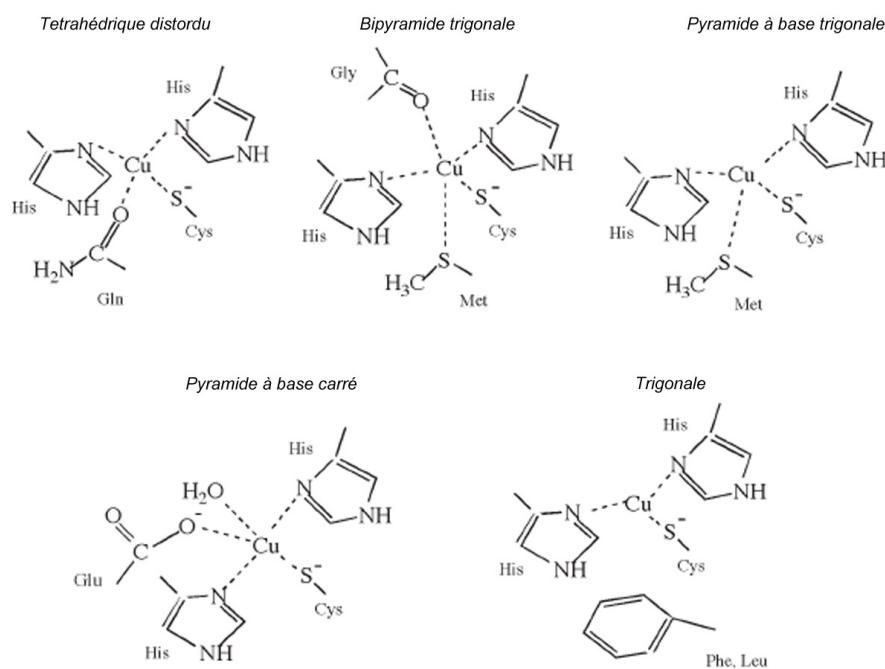


Figure I.1.2 : Structures de centre de type 1

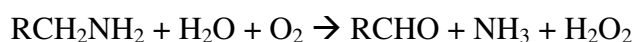
Les centres de type 1 sont dédiés au transfert d'un électron unique vers une cible. Ils se retrouvent souvent dans deux types de protéines :

- de petites protéines comme les cuprédoxines qui sont responsables du transfert d'électrons à d'autres protéines de plus grande taille comme dans les chaînes de transfert d'électrons (photosynthèse, dénitrification) ;
- des protéines ou complexes protéiques de grande taille qui associent plusieurs sites et servent de relais d'électrons dans la protéine, comme c'est le cas dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie.

○ Les centres de type 2 :

Ils se caractérisent par une bande d'absorption entre 600 et 700 nm plus faible que les centres de type 1, et un signal RPE caractéristique et distinct (MacPherson et Murphy 2007).

Le cuivre peut être coordonné par trois acides aminés ou plus, principalement des histidines, parfois également par des méthionines, des glutamates, des glutamines ou des tyrosines, mais jamais de cystéines. Il n'existe pas de séquence consensus permettant de définir le site de fixation du cuivre dans les centres de type 2. Il n'y a donc pas non plus de géométrie caractéristique dans ces sites. L'absence de ligand thiolate est responsable de l'absence de coloration marquée telle que celle que nous observons dans le cas des centres de type 1. La sphère de coordination du cuivre est moins rigide dans les centres de type 2 et le cuivre peut directement interagir avec un substrat. Ce type de centre est retrouvé dans des enzymes dont la fonction nécessite l'oxydation d'un substrat telles que les amines oxydases qui catalysent la désamination des amines en cétones suivant la réaction:



Les amines oxydases sont des enzymes ubiquitaires qui se retrouvent aussi bien chez les bactéries que chez les mammifères (Brazeau et coll. 2004).

- Les centres de type 3 :

Les centres de type 3 sont des centres à deux cuivres reliés par une molécule de dioxygène. Contrairement aux centres de types 1 et 2, les centres de type 3 n'ont pas de signal en RPE. Ils présentent une bande d'absorption dans le Visible entre 600 et 700 nm, ainsi qu'une bande d'absorption caractéristique à 345 nm (Decker et coll. 2007). La liaison de l'oxygène moléculaire peut être caractérisée par sa fréquence à 750 cm^{-1} . L'absence de signal en RPE est due au couplage des deux atomes de cuivre antiferromagnétiques pontés par un oxygène moléculaire qui constituent le site actif du centre. Chaque atome de cuivre est maintenu dans la protéine par trois histidines (figure I.1.3). La géométrie du site $\text{Cu-O}_2\text{-Cu}$ est plane et le substrat se présente perpendiculairement.

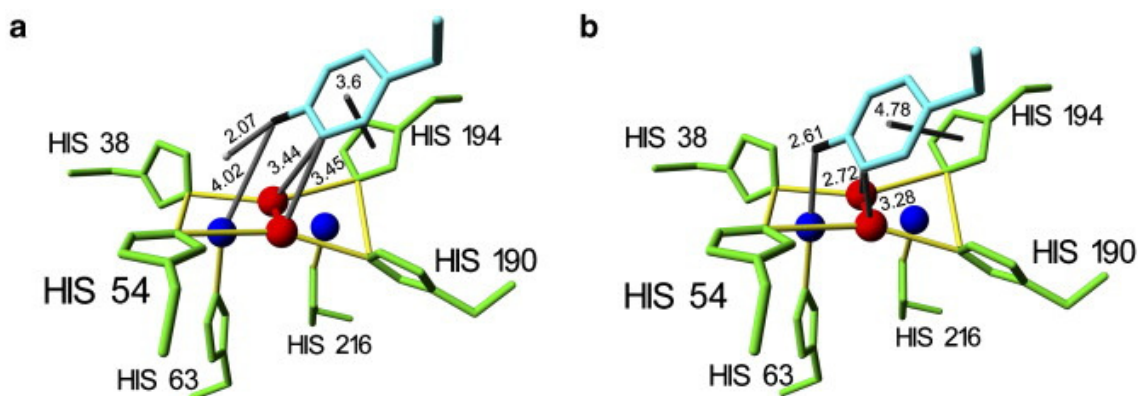


Figure I.1.3 Exemple de centre de type 3 : le site actif de la tyrosinase de *Streptomyces*
 cuivre: bleu ; histidine: vert ; dioxygène: rouge ; substrat phénolique: cyan (d'après (Decker et coll. 2007))
a conformation initiale du site actif après la fixation du substrat, d'après la structure cristallographique ; dans cette structure la distance entre le site à cuivre et le groupement hydroxyle du substrat est trop grande pour permettre la réaction. **b** conformation du site actif modélisé après le rapprochement entre les deux groupements à une distance raisonnable pour permettre la réaction.

L'hémocyanine, qui transporte l'oxygène à la place de l'hémoglobine chez les crustacés et les tyrosinases sont probablement les protéines de type 3 les plus connues et les mieux caractérisées.

1.4.2. La chélation du cuivre dans les systèmes biologiques.

Dans la cellule, le cuivre à l'état ionisé est généralement sous la forme Cu(I) et pris en charge par des chélateurs plus ou moins spécifiques. Ces chélateurs sont des peptides ou des protéines riches en cystéines, les groupements thiolates possédant une forte affinité pour les métaux mous et en particulier pour le Cu(I).

Le glutathion est un court peptide de trois acides aminés : un acide glutamique, une glycine et une cystéine, dont la fonction amine se condense avec l'acide carboxylique en γ de l'acide glutamique (Meister et Anderson 1983). Sa concentration intracellulaire varie entre 0,5 et 10 mM chez les eucaryotes et la diminution de cette concentration a des effets dramatiques pour la cellule. Les phytochélatines, découvertes en 1985 (Grill et coll. 1985), sont des assemblages de 2 à 11 molécules de glutathion connus pour leur capacité à chélater les métaux mous (Cd, Ag, Cu, Pb, Hg). Découvertes dans un premier temps chez les plantes, elles ont aussi été décrites chez les animaux (Cobbett 1999).

A ces peptides s'ajoutent également des protéines telles que les métallothionéines et les métallo-chaperonnes à cuivre. Les métallothionéines sont de petites protéines très riches en cystéines avec une grande affinité pour les métaux de transition (Kägi et Vallee 1960) qui

se trouvent aussi bien chez les bactéries, les plantes et les animaux que les champignons. Grâce à tous ces systèmes de chélation, le cuivre n'est pas présent sous forme libre dans le cytoplasme de la cellule (Rae et coll. 1999). Ainsi, les protéines qui ont besoin de cuivre dans la cellule ne peuvent-elles donc pas l'obtenir directement par simple collision au hasard et la cellule fait appel à des protéines dédiées au convoyage du cuivre, dénommées les métallo-chaperonnes à cuivre. Ces protéines seront décrites en détails dans le chapitre consacré à l'homéostasie du cuivre.

1.4.3. La toxicité cellulaire du cuivre

L'environnement cellulaire permet, en condition normale, une chélation optimale du cuivre qui garantit l'absence de cuivre libre dans la cellule. Lorsque les systèmes de protection sont dépassés, le cuivre peut se retrouver libre dans le cytoplasme, entraînant une série d'effets néfastes pour la cellule. Le premier d'entre eux est lié aux capacités pro-oxydantes du cuivre qui peut réagir efficacement avec le peroxyde d'hydrogène pour former des radicaux libres *via* la réaction de Fenton (Stohs et Bagchi 1995 ; Valko et coll. 2005). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules radicalaires très réactives qui peuvent endommager durablement tous les constituants de la cellule *via* l'oxydation des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Cette toxicité du cuivre est d'ailleurs utilisée dans nombre d'activités humaines (antifongiques, antibactériens, désherbants...). La présence de cuivre libre peut avoir d'autres effets dans la cellule. Tout d'abord le cuivre a une forte affinité pour les groupements thiolates et la liaison peptidique. Il peut ainsi se lier et inactiver les sites actifs de certaines enzymes ou former des complexes non spécifiques avec toutes sortes de protéines. Enfin le cuivre et certains autres métaux de transition ont des propriétés chimiques proches, et l'excès de l'un d'entre eux peut déplacer l'équilibre de certains cofacteurs métalliques avec leur site de liaison (Stohs et Bagchi 1995). C'est le cas notamment des protéines à doigt de zinc, au sein desquelles le Zn(II) peut être remplacé par le Cu(II), empêchant ces protéines de se lier à leurs séquences spécifiques sur l'ADN (Sarkar 1995).

2. L'homéostasie du cuivre

2.1. Le métabolisme du cuivre chez l'Homme

2.1.1. L'homéostasie du cuivre

Au sein d'un organisme humain adulte, la quantité de cuivre varie entre 75 et 150 mg principalement concentrés dans le foie, les muscles et les noyaux lenticulaires du cerveau. L'apport alimentaire journalier recommandé est de 1 à 3 mg par jour. Deux organes jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du cuivre. L'intestin qui est le lieu de l'absorption du cuivre alimentaire et le foie qui est l'organe régulateur où se fait la balance entre distribution et excrétion (figure I.2.1).

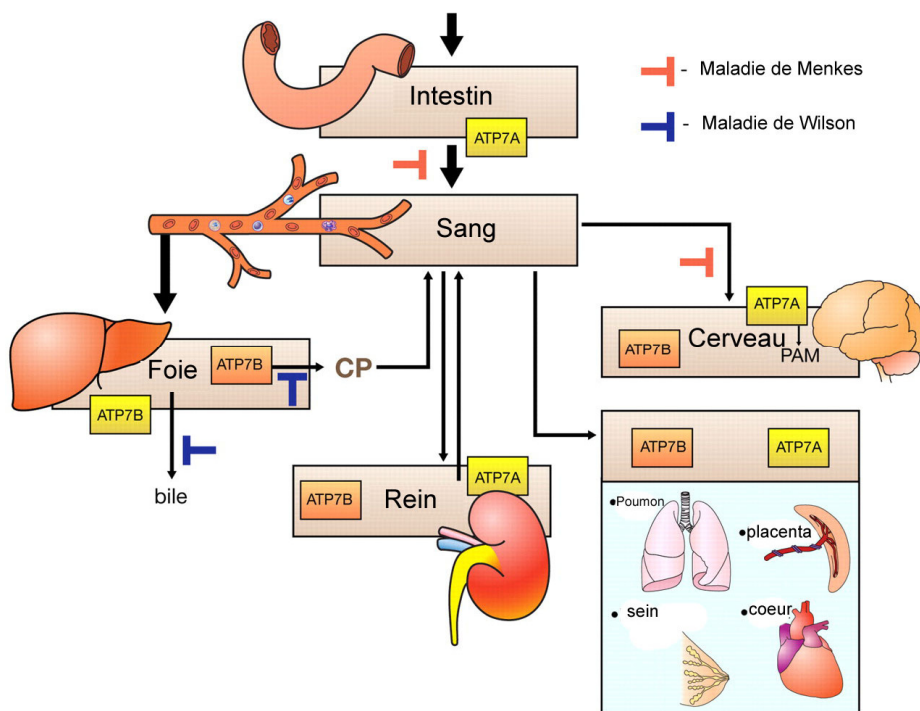


Figure I.2.1 : Distribution du cuivre dans l'organisme (d'après (Lutsenko et coll. 2007))

Au niveau de l'intestin, le cuivre traverse la membrane apicale des entérocytes par un transporteur de haute affinité hCtr1 (Zhou et Gitschier 1997; Nose et coll. 2006a). Cependant, la participation d'autres transporteurs tels que DMT1 ou hCtr2 n'est pas à exclure (Arredondo et coll. 2003; Bertinato et coll. 2008). En effet, l'inactivation sélective de Ctr1 dans l'intestin de souris bloque l'absorption du cuivre dans le sang, mais n'empêche pas l'accumulation du

cuivre dans les cellules intestinales (Nose et coll. 2006a). A l'intérieur des entérocytes, le cuivre est pris en charge par le glutathion et les protéines à cuivre. Parmi ces protéines, Atox1, une métallo-chaperonne à cuivre, le délivre à une ATPase localisée dans les membranes du réseau trans-golgien : l'ATPase de Menkes (Hamza et coll. 1999; Larin et coll. 1999). Lorsque la concentration intracellulaire de cuivre atteint un certain seuil, l'ATPase migre à la membrane basolatérale (Petrus et coll. 1996; Nyasae et coll. 2007) et exporte le cuivre dans la circulation sanguine où il est principalement pris en charge par l'albumine, la transcupréine et l'histidine jusqu'au foie (Linder et coll. 1998).

Dans le foie, le cuivre est capté par les hépatocytes pour être redistribué dans l'organisme ou expulsé lorsque sa concentration devient trop élevée. L'ATPase de Wilson, homologue à l'ATPase de Menkes, est l'acteur majeur de la balance entre distribution et détoxification. En condition normale, l'ATPase est immobilisée dans les membranes du réseau trans-golgien, où elle transfère le cuivre du cytosol vers la lumière. Il est alors disponible pour les enzymes à cuivre dont la céruloplasmine (CP sur le schéma de la figure I.2.1) qui assure le transport de 65 à 70 % du cuivre dans le sang (Hellman et Gitlin 2002). En condition de surcharge, l'ATPase migre vers la membrane apicale des hépatocytes, au niveau des canalicules biliaires dans lesquels est éliminé l'excès de cuivre (Terada et coll. 1999; Roelofsen et coll. 2000; Guo et coll. 2005). L'importance de cette voie de détoxification (98 % du cuivre excrété par l'organisme (de Bie et coll. 2007)) explique les conséquences dramatiques du dysfonctionnement de l'ATPase de Wilson chez les patients atteints de la maladie du même nom.

2.1.2. La maladie de Menkes

La maladie de Menkes a été décrite pour la première fois en 1962 par Menkes et coll. C'est une maladie génétique récessive liée au chromosome X qui touche une naissance sur 250 000. Elle se caractérise par une carence en cuivre généralisée de l'organisme, due au dysfonctionnement de l'ATPase de Menkes dont le gène ATP7A a été identifié en 1993 (Chelly et coll. 1993; Mercer et coll. 1993; Vulpe et coll. 1993).

Cliniquement, la maladie se caractérise par des symptômes diffus tels que hypothermie, dépigmentation de la peau et des cheveux, déminéralisation du squelette, retard du développement cérébral... Au niveau cellulaire, le dysfonctionnement de l'ATPase

entraîne un défaut d'absorption du cuivre par les cellules de l'épithélium intestinal et un défaut de cuivre dans les nombreuses enzymes à cuivre de l'organisme.

Le seul traitement existant consiste en l'administration de cuivre par injection intraveineuse à la mère pendant la grossesse, puis à l'enfant, afin de corriger le niveau de cuivre sérique. Néanmoins, à l'heure actuelle, il est impossible de corriger le défaut d'incorporation du cuivre dans les enzymes au niveau cellulaire et l'espérance de vie des patients reste limitée : entre 6 et 10 ans. Ainsi, lorsque la maladie est diagnostiquée pendant la grossesse, une interruption thérapeutique de grossesse est proposée à la mère.

2.1.3. La maladie de Wilson

La maladie de Wilson est une maladie génétique autosomale récessive dont l'évolution est fatale en l'absence de traitement. Elle est liée à une surcharge en cuivre de l'organisme due au dysfonctionnement de l'ATPase de Wilson. Elle se caractérise par une forte hétérogénéité de symptômes cliniques qui peuvent être rangés dans trois grandes catégories : les manifestations hépatiques, les manifestations neurologiques et les manifestations oculaires (anneaux de Kayser-Fleisher).

La maladie de Wilson a été décrite pour la première fois sous sa forme neurologique par Frerich en 1861, puis sous sa forme hépatique en 1912 par le Dr Wilson. Elle fut décrite comme un trouble du métabolisme du cuivre pour la première fois en 1948 par Cuning et Luthy et le premier traitement a vu le jour en 1951. Il fallut cependant attendre 1993 pour que le gène responsable de la maladie de Wilson soit identifié et caractérisé comme ATP7B sur le chromosome 13 par plusieurs équipes (Bull et coll. 1993; Chelly et Monaco 1993; Petrukhin et coll. 1993; Tanzi et coll. 1993; Yamaguchi et coll. 1993).

A ce jour, plus de 350 mutations du gène ATP7B ont été répertoriées¹. Parmi ces mutations, plus de 50 % sont des mutations faux sens et environ 30 % sont de petites insertions ou délétions de séquence conduisant bien souvent à l'apparition d'un codon stop prématuré. Les 20 % restant se partagent entre des mutations non sens et des mutations dans les sites d'épissages de l'ARNm. La prévalence de la maladie dans la population mondiale est d'environ un cas pour 30 000 naissances. Cependant la prévalence peut être beaucoup plus élevée dans certains contextes d'isolement géographique et génétique comme au Japon ou en Sardaigne.

¹ <http://www.medicalgenetics.med.ualberta.ca/wilson/index.php>

Il existe aujourd'hui plusieurs traitements disponibles qui, à l'exception de la transplantation du foie, sont tous chroniques et visent à rétablir une balance cuprique négative. Pour ce faire deux grandes stratégies sont utilisées :

- Réduire les apports alimentaires de cuivre par un régime pauvre en cuivre, d'une part par la diminution de l'absorption du cuivre et d'autre part grâce à un traitement au zinc ou au tétrathiomolybdate. L'administration de zinc stimule la production de métallothionéines dans les cellules intestinales, ce qui limite l'absorption du cuivre dans l'organisme. Le tétrathiomolybdate est un chélateur spécifique du cuivre dont le complexe n'est pas absorbable par l'intestin. De par sa toxicité, ce traitement n'est pratiqué qu'aux Etats-Unis sous haute surveillance médicale.
- Favoriser l'excrétion urinaire en mobilisant la fraction tissulaire par l'utilisation d'agents chélateurs tels que de la D-pénicillamine et la TRIENTINE®

2.2. L'homéostasie du cuivre chez la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*

La levure constitue un puissant modèle de cellule eucaryote et l'homéostasie du cuivre dans les cellules eucaryotes est très conservée, notamment entre la levure et les cellules de mammifère.

2.2.1. L'entrée du cuivre

Chez la levure, il existe deux mécanismes d'import du cuivre dans la cellule : un transport spécifique de haute affinité et un transport non spécifique de basse affinité.

2.2.1.1. Le transport de haute affinité

Avant d'être pris en charge par les transporteurs de haute affinité, le cuivre sous sa forme oxydée Cu(II) dans l'environnement est réduit sous sa forme Cu(I) par les réductases Fre1 et Fre2 au niveau de la membrane plasmique (Dancis et coll. 1992; Georgatsou et Alexandraki 1994; Hassett et Kosman 1995). Cette étape de réduction peut être évitée par l'ajout dans le milieu d'un réducteur chimique comme l'ascorbate.

Chez les eucaryotes, ce transport est pris en charge par la famille des transporteurs Ctr. La levure possède dans son génome trois de ces transporteurs, dont deux sont exprimés et actifs à la membrane plasmique : Ctr1 et Ctr3 (Dancis et coll. 1994; Knight et coll. 1996). Les alignements de séquences et les études de prédiction de structures établissent les principaux motifs de ces transporteurs. La résolution de la structure de l'homologue humain de Ctr1 inséré dans des bicouches lipidiques (Aller et Unger 2006) confirme la présence de trois segments transmembranaires comme le suggéraient les analyses bioinformatiques (figure I.2.2). La structure de hCtr1 confirme également l'organisation oligomérique, probablement trimérique, qui forme un canal spécifique des ions Cu(I). Bien que le mécanisme de transport au travers de Ctr1 soit encore mal caractérisé, un transport de type canal ionique est hautement improbable à cause de la nature toxique et de l'instabilité du Cu(I) en solution aqueuse. Cependant le transport du cuivre au travers de Ctr1 est indépendant de l'ATP et il s'agit probablement d'un transport par coordination du cuivre par les acides aminés de la protéine et les chélateurs cellulaires comme le glutathion. Ainsi le domaine N-terminal de Ctr1 situé du côté extracellulaire est riche en motifs méthionine (MxM ou MxxM) susceptibles de capturer le cuivre pour le délivrer aux segments transmembranaires de la protéine, *via* notamment un motif MxxM indispensable sur la deuxième hélice. Du côté cytoplasmique, le cuivre serait pris en charge par l'extrémité C-terminale de la protéine. Ce domaine riche en acides aminés chargés et présentant des motifs cystéine / histidine conservés, rendrait le cuivre disponible aux chélateurs du cytosol (Nose et coll. 2006b).

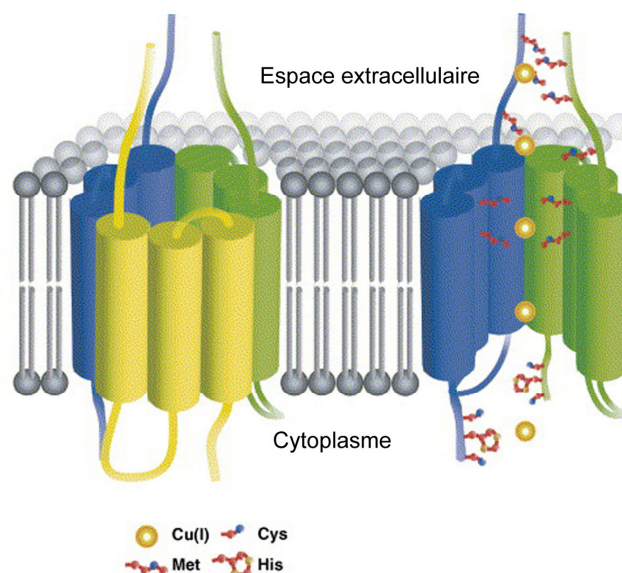


Figure I.2.2 : Représentation schématique de l'organisation de Ctr1 selon les données structurales de Aller et Unger (2006) (d'après (Nose et coll. 2006b))

L'import du cuivre par ces transporteurs de la membrane plasmique est finement régulé. La transcription de Ctr1 et Ctr3 est activée en réponse à une carence en cuivre *via* la fixation du régulateur Mac1 sur leurs promoteurs, favorisant ainsi l'influx du métal (Labbé et coll. 1997; Yamaguchi-Iwai et coll. 1997). Les régulations de ces deux transporteurs diffèrent au niveau post-traductionnel. L'ajout de 10 μ M de cuivre dans le milieu de culture entraîne une rapide endocytose de Ctr1 suivie par sa dégradation dans la vacuole (Ooi et coll. 1996; Liu et coll. 2007) tandis que Ctr3 est stable et localisé à la membrane plasmique pendant plus d'une heure (Peña et coll. 2000). Le mécanisme impliquant une endocytose rapide de Ctr1 permet probablement à la levure de couper efficacement l'import de cuivre dans la cellule. Cette régulation post-traductionnelle nécessite l'intervention de Mac1 par un mécanisme qui fait intervenir les voies de signalisation dépendant de l'ubiquitine (Liu et coll. 2007), mais qui reste à découvrir.

2.2.1.2. Le transport de basse affinité

Les transporteurs de métaux divalents participent également à l'import du cuivre dans la cellule (Li et Kaplan 1998). Plusieurs d'entre eux ont déjà été caractérisés comme capables de transporter le cuivre. Fet4 est un transporteur peu spécifique de métaux divalents impliqué dans le transport du fer de basse affinité, mais aussi du cuivre, du cadmium, du cobalt et du nickel (Dix et coll. 1994).

Les transporteurs de la famille des Nramp (NatuRal Associated Macrophage Protein) Smf1, Smf2 et Smf3 peuvent aussi être impliqués dans le transport du cuivre (Liu et coll. 1997; Cohen et coll. 2000). Cependant seul Smf1 a pu être détecté à la membrane plasmique. Smf2 est localisé dans des vésicules cytoplasmiques et Smf3 à la membrane de la vacuole (Portnoy et coll. 2000).

2.2.2. La distribution du cuivre cellulaire

La concentration de cuivre libre intracellulaire est estimée à 10^{-18} M (Rae et coll. 1999), soit moins d'un atome de cuivre libre par cellule. Ce résultat a été obtenu en comparant la concentration totale de cuivre intracellulaire aux capacités de chélation du cuivre de la

cellule. En effet l'environnement cellulaire réducteur est riche en thiolates dont l'affinité pour le cuivre est forte.

Le cuivre n'existant pas sous forme libre, des protéines spécifiques dites métallochaperonnes sont chargées de délivrer le cuivre à leurs cibles. Trois grandes voies sont aujourd'hui caractérisées (figure I.2.3) :

- l'approvisionnement en cuivre des enzymes de la voie sécrétoire au niveau du réseau trans-golgien ;
- l'approvisionnement de la Super Oxyde Dismutase cytosolique (SOD1), enzyme cruciale dans la lutte contre le stress oxydant ;
- l'approvisionnement en cuivre de la mitochondrie, indispensable au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire.

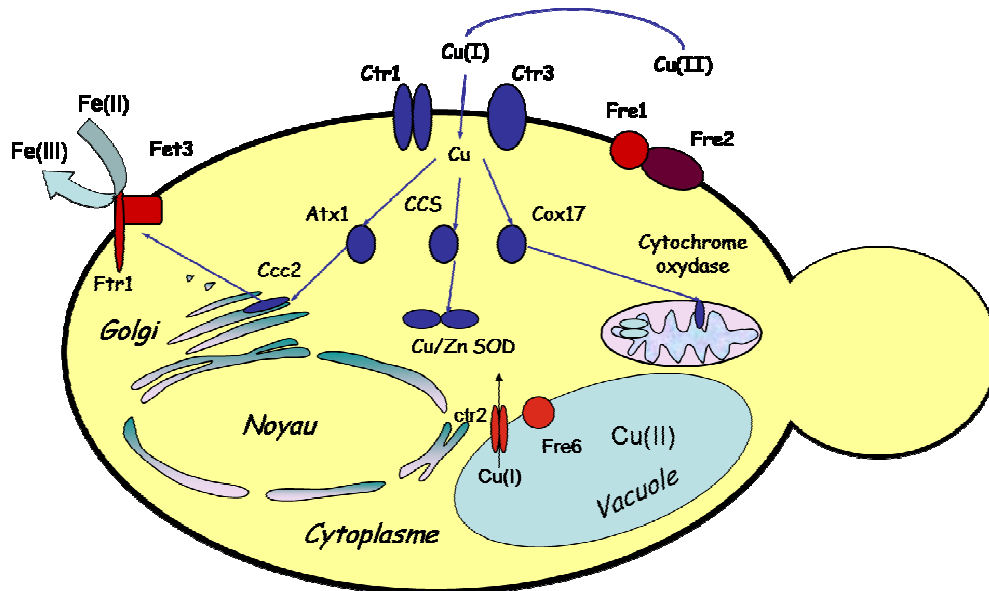


Figure I.2.3 : Homéostasie du cuivre chez *S. cerevisiae*

2.2.2.1. L'approvisionnement en cuivre de l'appareil de Golgi

L'approvisionnement en cuivre du réseau trans-golgien est assuré par la métallochaperonne Atx1 qui délivre le cuivre à l'ATPase Ccc2, protéine transmembranaire qui transfère le cuivre du cytosol vers la lumière du Golgi. Atx1 a été découverte à la faveur d'un crible de protéines capables de contrer le stress oxydant lié à la délétion de SOD1 (Lin et Culotta 1995). Son rôle dans le convoyage du cuivre fut mis en évidence en 1997 (Lin et coll.

1997; Pufahl et coll. 1997). Atx1 est une petite protéine de 73 acides aminés (8,2 kDa) qui présente un repliement de type ferredoxine $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (Rosenzweig et coll. 1999).

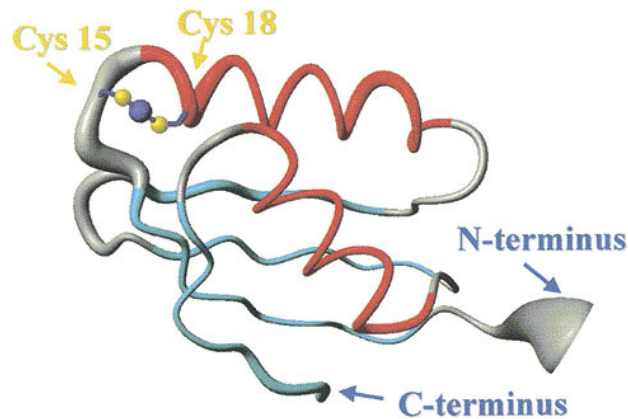


Figure I.2.4 : Structure en solution d'Atx1 (monomère) sous sa forme liée au cuivre (d'après (Arnesano et coll. 2001b; Banci et coll. 2004). Les cystéines 15 et 18 du motif CxxC sont indiquées.

Atx1 lie le cuivre au niveau d'un motif de type MxCxxC situé dans la boucle entre le premier feuillet β et la première hélice α (figure I.2.4). *In vitro* Atx1 peut lier un Cu(I) sous la forme d'un monomère avec un Kd de 10^{-20} M. Le Cu(I) y est tri-coordonné dans une géométrie trigonale (Pufahl et coll. 1997). Cependant comme le montre les données de structure aux rayons X (Rosenzweig et coll. 1999) et RMN (Arnesano et coll. 2001b), seules les deux cystéines du motif MxCxxC participent à la liaison du cuivre. La chaîne latérale de la méthionine est orientée vers le cœur hydrophobe de la protéine, participant ainsi à la stabilité de la structure. Un troisième ligand soufré est mis en évidence par EXAFS, mais il n'est pas identifié et les auteurs suggèrent dans leur expérience un rôle du DTT du tampon (Pufahl et coll. 1997). *In vivo*, le glutathion (GSH), dont la concentration cellulaire avoisine les 5 mM pourrait jouer le rôle du troisième ligand. En effet, il a récemment été montré *in vitro* que la présence de GSH entraîne la formation d'un dimère de la forme $\text{Cu(I)}_2(\text{GS}^-)_2(\text{Atx1})_2$ (Miras et coll. 2008). Il est donc possible que le GSH soit *in vivo* le troisième ligand et que le cuivre soit convoyé par Atx1 sous la forme d'un complexe avec le GSH.

2.2.2.2. L'approvisionnement en cuivre de la Super Oxyde Dismutase

La Super Oxyde Dismutase Cu/Zn (SOD1) est une enzyme majeure de la défense cellulaire contre le stress oxydant. Chez l'homme une déficience de cette enzyme est responsable de certaines formes de la sclérose latérale amyotrophique (Rosen et coll. 1993). SOD1 est une enzyme dimérique dont chaque monomère contient un atome de zinc et un

atome de cuivre. Le cuivre lui est délivré par la métallo-chaperonne Ccs nommée à l'origine Lys7 (Culotta et coll. 1997). Cette protéine est constituée de trois domaines structuraux distincts, caractérisés par le profil de digestion partielle de Ccs par la trypsine (Schmidt et coll. 1999). Le domaine N-terminal est un homologue structural d'Atx1 qui fixe le Cu(I) au niveau d'un motif MxCxxC. Ce motif permet de recruter le cuivre dans l'environnement cytosolique et de le délivrer au domaine C-terminal de Ccs. Ce dernier domaine, indispensable à la fonction de Ccs, est extrêmement conservé d'une espèce à l'autre. Il possède un motif de liaison du cuivre et serait responsable du transfert du cuivre à SOD1 (Lamb et coll. 1999). Enfin la partie centrale de Ccs est un domaine avec une forte homologie de séquence avec SOD1. Ce domaine est indispensable à l'interaction Ccs/SOD1 nécessaire au transfert du cuivre entre les deux protéines.

2.2.2.3. L'approvisionnement en cuivre de la mitochondrie

La cytochrome C oxydase (Cco) est un complexe protéique de plus de 12 sous-unités enchâssé dans la membrane interne de la mitochondrie (IM). Elle constitue un élément indispensable de la chaîne de phosphorylation oxydative de la mitochondrie. CuA et CuB sont deux sous-unités catalytiques de Cco contenant du cuivre dont la voie d'approvisionnement est encore mal caractérisée (figure I.2.5). En effet si les donneurs finaux de cuivre sont connus, la chaîne d'événements y menant reste à définir. Ainsi CuA obtient son cuivre par interaction avec la protéine Sco1 (Leary et coll. 2004). Sco1 est une protéine de l'espace intermembranaire capable de lier le Cu(I) *via* un motif conservé CxxxC faisant intervenir une histidine également conservée. CuB obtient son cuivre par une interaction avec la protéine Cox11 (Khalimonchuk et coll. 2005). Cox11 est un dimère dont chacune des sous-unités est enchâssée dans l'IM et fixe un Cu(I) par l'intermédiaire de trois cystéines essentielles. Des études *in vitro* ont montré que Cox11 et Sco1 peuvent interagir et acquérir leur cuivre *via* Cox17 (Horng et coll. 2004). Dans un mutant *cox17Δ*, Cco est inactive, ce qui se traduit au niveau phénotypique par une souche défailante pour la respiration (Glerum et coll. 1996). Cox17 est une petite protéine de 69 acides aminés dont la structure en double hélice α diffère de celle d'Atx1 : la liaison du cuivre se fait par l'intermédiaire d'un motif CCxC (Abajian et coll. 2004). De plus sa localisation à la fois cytosolique et mitochondriale laisse penser que Cox17 est responsable du convoyage du cuivre du cytosol vers la mitochondrie (Glerum et coll. 1996). Cependant la mitochondrie possède un stock de cuivre interne qui n'est lié ni à

l'ADN ni à des protéines, mais à un ligand anionique de bas poids moléculaire (Cobine et coll. 2004) qui n'est pas affecté par la délétion de Cox17 (Cobine et coll. 2006). Cox19 et Cox23 sont deux autres candidats pour le convoyage du cuivre à la mitochondrie. La délétion de chacun d'entre eux entraîne des défauts dans la chaîne respiratoire, liés à un défaut de fonctionnement de Cco. De plus, la localisation de Cox19 et Cox23 se partage entre le cytosol et la mitochondrie (Nobrega et coll. 2002; Barros et coll. 2004; Cobine et coll. 2006).

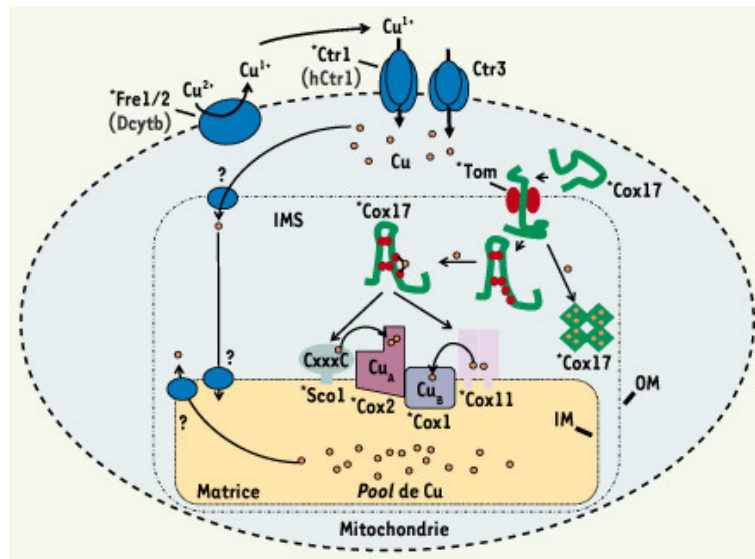


Figure I.2.5 : Modèle d'approvisionnement en cuivre de la Cco chez *S. cerevisiae* (d'après (Laliberté et Labbé 2008))

En résumé, le convoyage du cuivre vers les sous-unités de Cco est une voie complexe. Sco1 et Cox11 sont les donneurs finaux aux sites CuA et CuB. Le rôle de Cox17 en tant que donneur de cuivre à Sco1 et Cox11 est bien établi, mais celui de Cox19 et Cox23 reste à définir. A l'heure actuelle, la source du cuivre intra-mitochondrial n'est pas encore identifiée et la voie qui délivre le cuivre à la mitochondrie reste à préciser.

2.2.3. Stockage et détoxication du cuivre

Le mécanisme d'incorporation du cuivre dans les métallo-chaperonnes est aujourd'hui inconnu. En effet, à ce jour, les efforts entrepris pour identifier des interactions entre les chaperonnes et les transporteurs de cuivre n'ont pas abouti (Portnoy et coll. 2001). Si des interactions et des échanges de cuivre *in vitro* ont bien été mis en évidence entre Atx1 et Ctr1 de levure, la séquence d'interaction de Ctr1 avec Atx1 est spécifique de Ctr1 de *S. cerevisiae*

et n'est donc pas transposable aux autres espèces ou chaperonnes (Xiao et Wedd 2002; Xiao et coll. 2004). Ces résultats, ainsi que la variété des transporteurs capables d'importer le cuivre et celle des protéines cibles font qu'il est difficile d'imaginer un mécanisme d'interaction transporteur métal-chaperonne pour le stockage du cuivre intracellulaire. En 2004, a été découvert un complexe de cuivre non protéique de bas poids moléculaire dans la mitochondrie. Cette découverte permet d'imaginer l'existence de ce type de complexe non protéique comme réserve de cuivre dans le cytosol (Cobine et coll. 2004).

2.2.3.1. Le rôle du glutathion

Le GSH est un petit peptide de trois acides aminés γ Glu-Cys-Gly qui joue un rôle important dans la chélation des métaux (Meister et Anderson 1983). La concentration millimolaire de GSH dans la cellule le place comme un bon candidat pour le rôle de réservoir intracellulaire de cuivre échangeable. En effet (i) des études montrent que le cuivre est d'abord pris en charge par le GSH avant d'être incorporé dans les métal-chaperonnes et thionéines (Freedman et coll. 1989; Lin et coll. 1993), (ii) le cuivre des métallothionéines est très peu échangeable (Jensen et coll. 1996) et enfin (iii) *in vitro* l'incorporation du Cu(I) dans des protéines riches en thiols telles que la céruloplasmine ou SOD1 est favorisée par la présence de GSH (Ciriolo et coll. 1990 ; Musci et coll. 1996).

Le GSH est un peptide important pour la détoxification des espèces réactives de l'oxygène produites lors d'un stress métallique notamment *via* la glutathion réductase qui utilise le GSH pour recycler les groupements thiolates oxydés. De plus le GSH participe à la détoxification des métaux mous. C'est par exemple sous une forme complexée au GSH qu'est éliminé le Cd(II) par le transporteur ABC Ycf1 dans la vacuole (Li et coll. 1996). Les phytochélatines, elles aussi, jouent un rôle essentiel dans la chélation des métaux mous chez les plantes.

Une étude de Gharieb et Gadd en 2004 montre qu'une souche de levure déficiente pour la synthèse du GSH n'est pas plus sensible au cuivre que le type sauvage (Gharieb et Gadd 2004). Cependant dans cette étude, la synthèse du GSH est bloquée par la délétion de *GSH2*, le gène codant pour la deuxième étape de la synthèse du GSH. Or nous pourrions noter que *GSH1*, le gène codant pour l'enzyme de la première étape permet la synthèse du peptide γ -Glu-Cys. La souche *gsh2Δ* accumule donc tout de même un dipeptide cystéine-glutamate dont les groupements thiol de la cystéine et acide du glutamate ont une bonne affinité pour le

cuivre et donc potentiellement une bonne capacité à chélater le cuivre. La transcription de *GSH1* est activée en présence de mercure ou de cadmium dans le milieu, mais aucun effet n'est observé en présence de cuivre ou de fer (Westwater et coll. 2002). Ainsi, s'il a bien été montré que le GSH est un bon chélateur de métaux mous, qu'il participe à la détoxification des ROS et qu'il participe à l'homéostasie du cuivre, les données bibliographiques ne permettent pas d'affirmer un rôle prépondérant du GSH dans la détoxification du cuivre.

2.2.3.2. Le rôle de la vacuole

La vacuole est un organe central à de nombreux égards tels que la dégradation, le recyclage, le stockage et la détoxification. Ainsi, dans le cas du cuivre, la vacuole joue-t-elle un rôle à la fois dans le stockage et la détoxification.

En carence de cuivre le transporteur Ctr2 localisé à la membrane de la vacuole permet de mobiliser le stock de cuivre intra-vacuolaire (Rees et coll. 2004; Rees et Thiele 2007). Aucun transporteur de cuivre vers la lumière de la vacuole n'a pour le moment été mis en évidence, le cuivre pouvant tout simplement provenir du recyclage des protéines dégradées dans la vacuole.

Szczyпка et coll. en 1997 ont montré toute l'importance de la vacuole dans la détoxification du cuivre (Szczyпка et coll. 1997). En effet, des mutants de la synthèse de la vacuole telle que *pep3Δ* et *pep5Δ* présentent une sensibilité accrue au cuivre. Tout récemment, Jo et coll. ont montré que de nombreuses protéines impliquées dans la biogenèse de la vacuole et dans le trafic des protéines vers la vacuole sont importantes dans la réponse à un stress cuivre (Jo et coll. 2008). Les détails de l'implication de la vacuole dans la réponse au stress cuivre sont inconnus. Cependant l'acidification de la vacuole est un paramètre important et la délétion de sous-unités de l'ATPase proton de la membrane vacuolaire entraîne une hypersensibilité au cuivre (Eide et coll. 1993; Szczyпка et coll. 1997; van Bakel et coll. 2005).

2.2.3.3. Le rôle des métallothionéines.

Les métallothionéines sont de petites protéines riches en cystéines (30 % de leur séquence), constituées de deux sous-unités α et β de 6 et 7 kDa. Dans ces protéines, le cuivre est enfoui profondément dans la structure de la protéine, lié par plusieurs cystéines au niveau

de motifs CxC ou CC (figure I.2.6). Ainsi la coordination du cuivre par de multiples cystéines au cœur des métallothionéines le rend difficilement échangeable avec les protéines du cytosol.

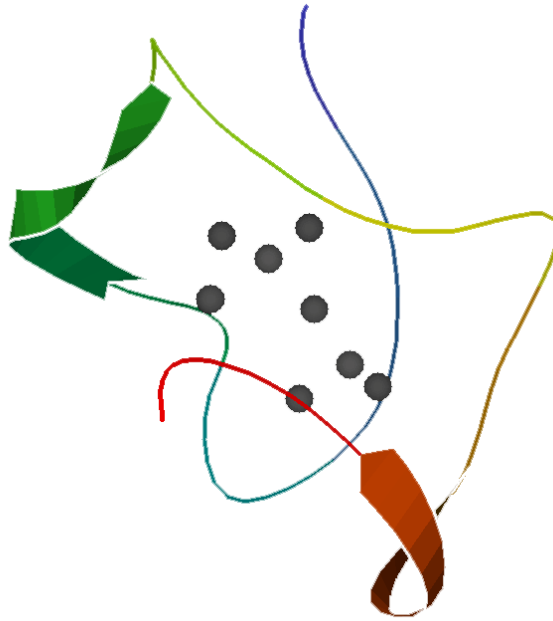


Figure I.2.6 : Structure de Cup1 d'après (Calderone et coll. 2005) ;
les boules grises représentent les atomes de cuivre fixés à Cup1 dans cette structure

Les métallothionéines forment la première ligne de défense de la levure. Chez *S. cerevisiae* elles sont au nombre de deux : CRS5 et Cup1 (Hamer et coll. 1985; Culotta et coll. 1994; Jensen et coll. 1996). La délétion de Cup1, par exemple, entraîne une sensibilité au cuivre dès 300 μ M contre 1,75 mM de CuSO_4 pour le type sauvage (Brenes-Pomales et coll. 1955). La transcription de ces deux protéines est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel Ace1 qui active leur transcription lorsque la concentration en cuivre devient trop importante (Thiele 1988).

En conclusion, face à la toxicité du cuivre, la cellule déploie tout un arsenal de mécanismes de défense. Dans ce chapitre, des mécanismes plus anecdotiques pourraient être cités, tels que la minéralisation du cuivre à la surface de la cellule sous la forme de CuS (Ashida et coll. 1963; Yu et coll. 1996) ou encore l'oxydation du Cu(I) en Cu(II) par Fet3 (Shi et coll. 2003).

2.2.4. Homéostasie du cuivre et homéostasie du fer : un lien étroit

Le système d'import de fer de haute affinité de la levure *S. cerevisiae*, a besoin de cuivre pour être actif (Shi et coll. 2003). Il représente donc un bon exemple de l'imbrication des homéostasies du fer et du cuivre (figure I.2.7).

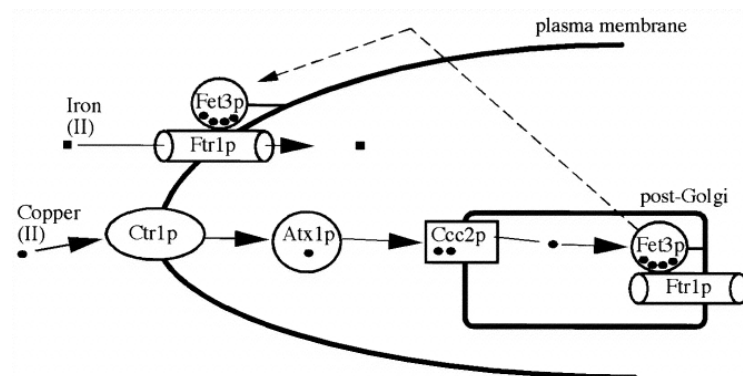


Figure I.2.7 Imbrication de l'homéostasie du fer et du cuivre chez la levure *S. cerevisiae* (Forbes et Cox 1998). Le cuivre est convoyé à l'intérieur du post-Golgi par Ccc2 via Atx1. Le cuivre active Fet3, le complexe Fet3/Ftr1 migre à la membrane plasmique et participe à l'influx de fer.

L'import de fer de haute affinité chez la levure est principalement assuré par le complexe protéique Fet3/Ftr1. Le fer ferrique Fe(III) de l'environnement est réduit en fer ferreux Fe(II) par les réductases de la famille Fre également responsables de la réduction du Cu(II) pour l'import de cuivre de haute affinité par Ctr1. Ce processus permet la mobilisation du fer extracellulaire. Ensuite, la protéine Fet3, glycoprotéine extracellulaire homologue à la céruloplasmine humaine, oxyde le Fe(II) en Fe(III) (Askwith et coll. 1994; De Silva et coll. 1995). Fet3 agit de concert avec la perméase transmembranaire Ftr1 qui permet la translocation de Fe(III) au travers de la membrane plasmique. Une caractéristique de ce système est l'assemblage et l'activation du complexe Fet3/Ftr1 dans le Golgi. Afin d'être opérationnelle, la protéine Fet3 est chargée en cuivre dans le Golgi par l'intermédiaire de l'ATPase Ccc2 et sa migration à la membrane plasmique implique la présence de Ftr1 (Stearman et coll. 1996; Hassett et coll. 1998; Singh et coll. 2006). Le complexe ainsi formé est alors fonctionnel et peut assurer le transport du fer de haute affinité. De ce fait une carence en cuivre peut rapidement entraîner une carence en fer si la concentration en fer du milieu est limitante.

2.2.5. La régulation de l'homéostasie du cuivre

L'homéostasie du cuivre chez la levure est sous la dépendance principale de deux régulateurs transcriptionnels : Mac1 et Ace1.

2.2.5.1. Réponse cellulaire à une carence en cuivre

La réponse cellulaire directe à une carence en cuivre est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel Mac1 (Jungmann et coll. 1993; Georgatsou et coll. 1997). L'activation de Mac1 entraîne la surexpression des gènes impliqués dans l'import de cuivre de haute affinité, Ctr1 et Ctr3, et les métallo-réductases associées Fre1 et Fre7 (Labbé et coll. 1997; Yamaguchi-Iwai et coll. 1997). Mac1 est une protéine de 417 acides aminés constitutivement localisée dans le noyau (figure I.2.8). Elle possède un domaine N-terminal riche en cystéines, responsable de la fixation du cuivre et de l'inhibition de la liaison à l'ADN en réponse à l'élévation de la concentration en cuivre dans la cellule (Graden et Winge 1997). Mac1 se lie à l'ADN *via* son domaine C-terminal au niveau d'une séquence consensus spécifique du promoteur des gènes cibles. La liaison de Mac1 répond à la diminution de la concentration en cuivre dans la cellule. Mac1 est spécifiquement dégradé lorsque la concentration en cuivre devient trop grande par un mécanisme qu'il reste à élucider (Zhu et coll. 1998). Outre cette augmentation de ses capacités d'import, la levure peut mobiliser son stock de cuivre intracellulaire, grâce au transporteur de cuivre vacuolaire Ctr2 et à sa métallo-réductase Fre6 (De Freitas et coll. 2004; Rees et coll. 2004).

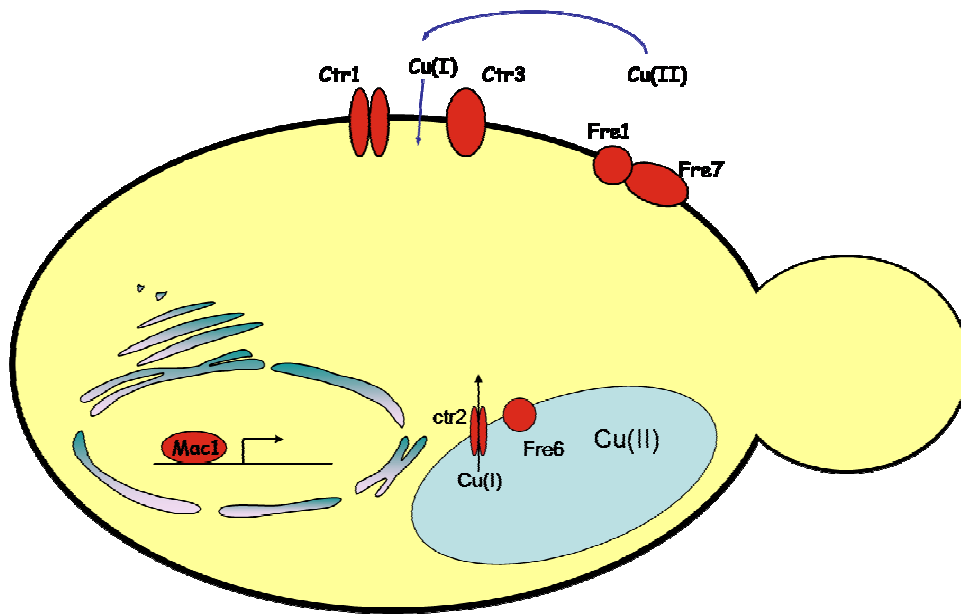


Figure I.2.8 : Réponse cellulaire à une carence en cuivre
Sont représentées en rouge les protéines surexprimées en carence de cuivre.

Par l'implication du cuivre dans le métabolisme du fer, une carence en cuivre entraîne généralement une carence en fer, qui se matérialise par une surexpression des gènes liés à l'import de fer à haute affinité *via* le facteur de transcription Aft1 : *FET3*, *FTR1*, *FRE1*, *FRE2*, *CCC2* et *ATX1*. Les études transcriptomiques montrent que la délétion (De Freitas et coll. 2004) ou la présence de Mac1 constitutivement actif (Gross et coll. 2000) ont de multiples effets sur le métabolisme général. Ainsi une carence prolongée en cuivre telle que le simule le mutant dépourvu de *MAC1* se traduit par une répression des protéines à cuivre et à fer comme celles de la respiration ou encore perturbe l'homéostasie d'autres métaux de transition tel que le zinc.

2.2.5.2. Réponse cellulaire à un excès de cuivre

La détoxification du cuivre chez la levure est sous le contrôle de l'activateur transcriptionnel Ace1 (Thiele 1988). Ace1 est une protéine nucléaire de 225 acides aminés composée de deux domaines, un premier riche en cystéines fixant le cuivre et un second, acide, responsable de la liaison à l'ADN sur une séquence consensus spécifique en amont des gènes de détoxification du cuivre (Huibregtse et coll. 1989; Szczypka et Thiele 1989).

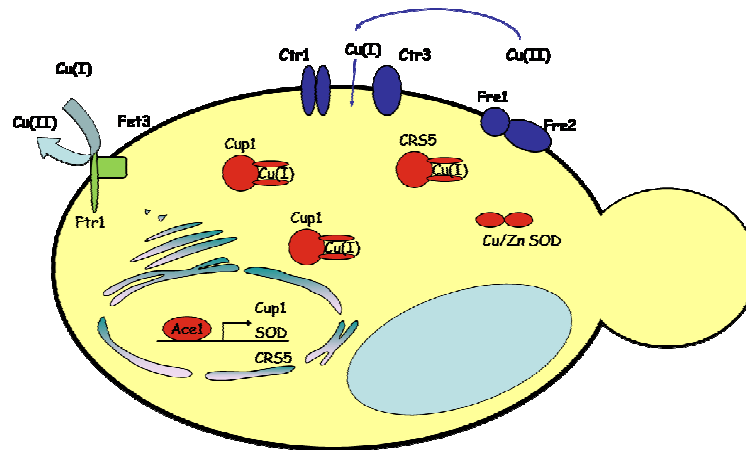


Figure I.2.9 : Réponse cellulaire à un excès de cuivre

Sont représentées en rouge les protéines surexprimées et en bleu les protéines réprimées.

Au contraire d'autres espèces telles que la levure *Candida albicans* où la détoxification du cuivre met en jeu à la fois des mécanismes de chélation et d'efflux (Weissman et coll. 2000; Weissman et coll. 2002), la détoxification chez *S. cerevisiae* passe principalement par la chélation du cuivre par les métallothionéines Cup1 et CRS5 (figure I.2.9). La protection contre les dommages liés au stress oxydant induit par le cuivre est prise en charge *via* la surexpression de SOD1 et de la catalase cytosolique CTT1 (Lapinskas et coll. 1993).

3. Les ATPases de type P

La définition de la vie est un exercice difficile. D'après les travaux de la NASA, un être vivant peut se définir comme un système délimité par une membrane semi-perméable de sa fabrication, capable de s'auto-entretenir et de se reproduire à partir d'éléments pris dans son environnement. Une notion importante dans cette définition est la délimitation par rapport à l'environnement et aussi l'échange avec le milieu extérieur. Les cellules qui sont à la base de la vie sur terre réalisent cette prouesse grâce à leur membrane plasmique. En effet une membrane biologique est une bicouche lipidique imperméable dans laquelle sont insérées des protéines qui permettent de contrôler le trafic des molécules entre l'environnement extérieur et l'intérieur de la cellule. Plusieurs types de transports caractérisent les échanges cellulaires :

- Les transports passifs :
 - La diffusion simple : elle concerne les petites molécules apolaires ou non chargées capables de diffuser librement à travers la bicouche lipidique.
 - La diffusion facilitée : des protéines insérées dans la membrane facilitent le passage de molécules au travers de la membrane.

Dans chacun de ces deux mécanismes le transport des molécules s'effectue toujours dans le sens du gradient électrochimique, c'est-à-dire du compartiment au potentiel le plus élevé vers le compartiment au potentiel le plus bas.

- Les transports actifs
 - Le transport actif primaire : la protéine utilise directement l'énergie issue d'une réaction exo-énergétique ayant lieu en son sein.
 - Le transport actif secondaire : la protéine utilise l'énergie fournie par la dissipation d'un autre gradient électrochimique (voir ci-dessus) entretenu par un transporteur actif primaire.

Les transporteurs actifs réalisent donc le transport de molécules contre leur gradient électrochimique, ce qui permet notamment à la cellule de concentrer une molécule dans un compartiment donné.

3.1. Propriétés générales

Les ATPases de type P sont représentées dans tous les règnes vivants, des bactéries aux mammifères en passant par les plantes et les champignons. Seuls quelques rares procaryotes en sont dépourvus. Le génome de *S. cerevisiae*, notre modèle d'étude, en regroupe 16 (Catty et coll. 1997). Elles transportent au travers des membranes et contre leur gradient électrochimique des ions aussi divers que Na^+ , K^+ , H^+ , Mg^{2+} , Cu^+ ... grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Ces ATPases ont des rôles variés qui diffèrent selon les espèces et selon leur localisation dans la cellule. L'un de leurs rôles majeurs, à l'origine de leur découverte est l'homéostasie ionique et la génération du potentiel de membrane indispensable à de nombreux processus cellulaires (Skou 1957). La famille des ATPases de type P est définie par un certain nombre de structures et séquences conservées au cours de l'évolution (figure I.3.1). Elle s'organise autour d'un cœur conservé de 4 hélices transmembranaires, un domaine activateur, un domaine de phosphorylation et du domaine de liaison de l'ATP, bordé par 3 à 6 hélices transmembranaires réparties de part et d'autre du cœur de la protéine.

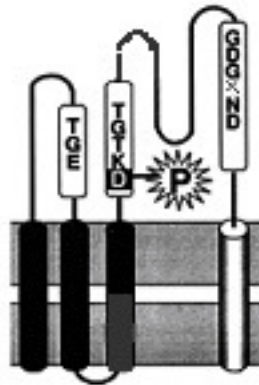


Figure I.3.1 : Représentation schématique du cœur d'une ATPase de type P

3.1.1. La grande boucle cytoplasmique

La **grande boucle cytoplasmique** est constituée de deux entités structurales clairement définies :

- le **domaine N** contient le site de liaison de l'ATP par la partie nucléotidique. Ce domaine constitue une insertion entre les séquences formant le domaine P. Les différentes structures disponibles permettent de dégager une structure commune comprenant un feuillet β antiparallèle à 7 brins, entouré par 2 faisceaux d'hélices α .

- **le domaine P** contient le site de phosphorylation. Il est constitué de deux séquences ancrées à la membrane et adopte un repliement de type Rosman comprenant un feuillet β à 7 brins parallèles associé à 8 hélices α .

L'ensemble forme le domaine catalytique et présente trois séquences d'acides aminés invariables, véritables signatures des ATPases de type P (Lutsenko et Kaplan 1995; Møller et coll. 1996; Axelsen et Palmgren 1998).

- La séquence invariable **DKTGT** dont l'acide aspartique D est phosphorylé au cours du cycle catalytique. La formation de cet **intermédiaire phosphorylé** covalent est liée au processus de transport ionique et a donné leur nom aux ATPases de type P.

- Le motif **MxTGD** est localisé en aval du motif de phosphorylation DKTGT et tient également un rôle important dans la phosphorylation.

- Le motif **TGDGxNDxP** est situé à la suite de la séquence MxTGD dans une région très flexible (encore appelée 'hinge' pour charnière).

3.1.2. La petite boucle cytoplasmique

La **petite boucle cytoplasmique**, ou domaine A pour « actuator », est adjacente au domaine catalytique et présente le motif **TGE** conservé. Dans l'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, ce domaine est organisé en un tonneau β de 10 brins et 2 hélices α . L'importance de ce motif a été clairement démontré sur cette ATPase car la modification de chaque acide aminé du motif diminue drastiquement l'activité ATPase (Fagan et Saier 1994). Le domaine A est supposé être en interaction avec le domaine catalytique (figure I.3.2) ; il est responsable de la déphosphorylation de l'ATPase à la fin du cycle (Anthonisen et coll. 2006).

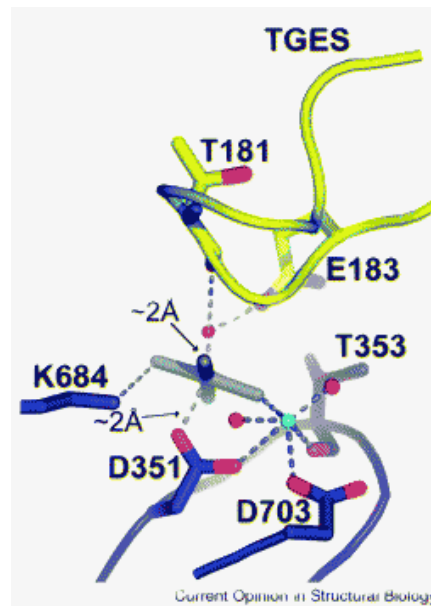


Figure I.3.2 : Détail structural du mécanisme de déphosphorylation de l'ATPase à calcium grâce au motif TGE du domaine A

Lors de la réaction de déphosphorylation, la liaison acyl-phosphate sur l'acide aspartique du motif D³⁵¹KTGT du domaine P (bleu) est hydrolysée une molécule d'eau activée par la thréonine 181 et l'acide glutamique 183 du motif TGE du domaine A (jaune) (d'après (Møller et coll. 2005))

3.2. Structure des ATPases de type P

La structure tridimensionnelle de l'ATPase à calcium du réticulum sarcoplasmique a été obtenue en 2000 à une résolution de 2.6 Å en présence de 10 mM de calcium (Toyoshima 2000). Récemment, les structures des ATPases à protons d'une part, et à sodium et potassium d'autre part, ont été résolues (Morth et coll. 2007; Pedersen et coll. 2007). La première remarque que nous pouvons faire est que malgré la faible homologie de séquence entre ces ATPases (20 % d'homologie entre l'ATPase-H⁺ et l'ATPase-Ca²⁺), la structure générale est remarquablement bien conservée, laissant supposer que la spécificité ionique de ces ATPases est largement due au site de transport de l'ion. Ces trois ATPases sont des ATPases de type P2 et possèdent 10 hélices α transmembranaires organisées en un faisceau. L'essentiel de la protéine est cytosolique, comprenant une grande boucle cytoplasmique constituée des domaines N et P entre les hélices 4 et 5 et une petite boucle cytoplasmique entre les hélices 2 et 3 (figure I.3.3). Le site de transport des ions est intra-membranaire, il implique divers acides aminés des hélices 4, 5, 6 et 8.

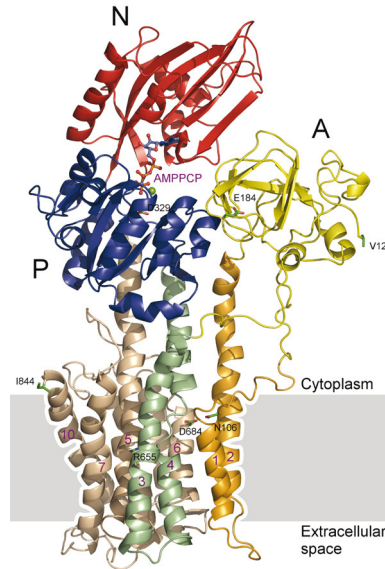


Figure I.3.3 : Structure de la forme active de l'ATPase- H^+ complexée au Mg-AMPPCP
bleu: domaine P ; rouge: domaine N ; jaune: domaine A (d'après (Pedersen et coll. 2007))

La structure de l'ATPase- Na^+/K^+ a été obtenue sous sa forme occluse en présence de Rb^+ . L'intérêt du Rb^+ est d'être un analogue du potassium dont la densité électronique est suffisante pour être détectable par rayons X. Cette expérience a permis de visualiser directement la position du potassium dans les membranes et par conséquent les acides aminés suffisamment proches pour interagir avec celui-ci. Ce résultat confirme l'importance d'acides aminés dont le rôle avait été mis en évidence par mutagenèse dirigée.

La cavité définie par le site de transport de l'ATPase- H^+ est d'une taille beaucoup plus grande que celle de ses homologues, l'ATPase- Ca^{2+} et l'ATPases- Na^+/K^+ . Avec un volume de 380 \AA^3 , la cavité du site de transport de l'ATPase- H^+ peut loger une douzaine de molécules d'eau. Ce résultat montre le rôle essentiel des sites de transport membranaires dans la sélectivité ionique des ATPases. La grande ressemblance structurale entre le site de transport de l'ATPase- Ca^{2+} et celui de l'ATPase- Na^+/K^+ laisse présager des difficultés dans la recherche des déterminants de la sélectivité ionique de ces protéines.

En l'absence d'ATP, les ions se fixent spontanément aux sites de transport. Leur déplacement à l'encontre de leur gradient électrochimique utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP et suit un cycle catalytique très précis qui assure le couplage entre le déplacement de l'ion et la réaction qui fournit l'énergie.

3.3. Cycle catalytique des ATPases de type P

L'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique (Sercal1a) est l'ATPase qui sert de modèle aux ATPases de type P. Naturellement abondante et donc facile à étudier, elle est la mieux connue d'un point de vue enzymatique.

La protéine Sercal1a suit un cycle catalytique qui consomme une molécule d'ATP pour le passage de deux ions calcium du cytosol vers l'intérieur du réticulum sarcoplasmique. Ce cycle est caractérisé par des réactions couplées de translocation de Ca^{2+} et d'hydrolyse de l'ATP et passe par un intermédiaire phosphorylé (Jencks 1989). Il est représenté de façon simplifiée dans la figure I.3.4.

- (1) L'enzyme ayant fixé le calcium sur sa face cytosolique (**Ca_2E**) subit un changement de conformation. Ceci induit sa phosphorylation par l'ATP en présence de magnésium pour générer le dérivé phosphorylé **$\text{Ca}_2\text{E}\sim\text{PMg}$** .
- (2) Le phosphoryl-enzyme obtenu, $\text{Ca}_2\text{E}\sim\text{PMg}$, est par nature instable et subit un changement de conformation qui se traduit par une diminution de l'affinité des sites pour le calcium : les ions calcium sont alors relâchés dans le compartiment interne du réticulum sarcoplasmique et l'enzyme est sous la forme **$\text{E}\sim\text{PMg}$** .
- (3) La liaison covalente de l'intermédiaire $\text{E}\sim\text{PMg}$ est hydrolysée et l'enzyme est de nouveau prête à recommencer son cycle (état **E**).
- (4) Les sites étant de nouveau de haute affinité, l'enzyme fixe le calcium du cytosol.

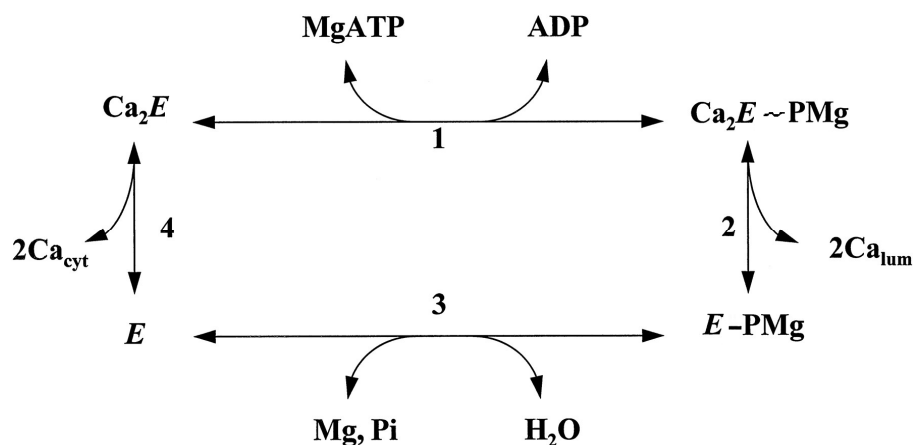


Figure I.3.4 : Cycle de l'ATPase- Ca^{2+} (d'après Jencks 1989)

3.4. Classification des ATPases de type P

La classification des ATPases de type P présente cinq branches, de I à V, selon Kristian Axelsen et Michael Palmgren (Axelsen et Palmgren 1998) ou trois branches si l'on considère la première classification proposée par Svetlana Lutsenko et Jack Kaplan (Lutsenko et Kaplan 1995). Cette dernière classification a été adoptée ici (figure I.3.5).

3.4.1. Les ATPases de type P1

Parmi les moyens de défense des cellules lors de pollution par les métaux lourds, les ATPases de type P1 sont responsables de l'expulsion de ces métaux hors du cytoplasme. Ces protéines qui participent à l'homéostasie des oligo-éléments physiologiques comme le cuivre ou le zinc, s'accommodent aussi de métaux exogènes et éventuellement toxiques comme le cadmium, le plomb ou le cobalt. Cette branche peut être subdivisée en deux sous-familles : les pompes à cations monovalents et les pompes à cations divalents (Rensing et coll. 1999).

- **Les ATPases à cuivre(I) ou argent(I)** sont des transporteurs de métaux mous monovalents. Les membres de ce groupe incluent les ATPases à cuivre humaines : la protéine de Menkes et la protéine de Wilson. L'ATPase à cuivre Ccc2 (Fu et coll. 1995) en fait également partie. Parmi les homologues bactériens, il y a CopA et CopB de *Enterococcus hirae* (Odermatt et coll. 1992). Des ATPases proches incluent la pompe à argent SilP de *Salmonella typhimurium* (Gupta et coll. 1999).

- **Les ATPases à zinc(II)/ cadmium(II)/ plomb(II) ou cobalt(II)**, sont des transporteurs de métaux mous divalents. Ces pompes à métaux incluent ZntA de *Escherichia coli* (Beard et coll. 1997), CadA de *Staphylococcus aureus* (Nucifora et coll. 1989), PbrA de *Ralstonia metallidurans* CH34 (Borremans et coll. 2001) et CoaT de *Synechocystis* PCC 6803 (Rutherford et coll. 1999).

Appelées aussi ATPases à métaux mous, les ATPases de type P1 seraient constituées de huit hélices transmembranaires d'après les prédictions de topologie (Lutsenko et Kaplan 1995). De plus, la région N-terminale de ces protéines est constituée d'un nombre variable de domaines de liaisons aux métaux lourds, qui pour la plupart, sont similaires aux métallo-chaperonnes à cuivre de type Atx1. Les caractéristiques de ces ATPases seront développées

dans un chapitre spécialement consacré aux ATPases à cuivre, vue l'importance de ces protéines pour cette thèse.

3.4.2. Les ATPases de type P2

Les ATPases de type P2 sont impliquées dans le transport des cations alcalins (H^+ , K^+ , Na^+) ou des cations alcalino-terreux (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Deux exemples bien caractérisés sont l'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique et l'ATPase Na^+/K^+ . Les ATPases- H^+/K^+ , les ATPases- H^+ et les ATPases- Mg^{2+} entrent aussi dans cette catégorie. Il existe également des ATPases assurant le transport d'aminophospholipides qui pourraient contribuer à l'asymétrie de la bicouche lipidique (Tang et coll. 1996). Les ATPases de type P2 sont constituées de 10 hélices transmembranaires, comme l'indiquent les structures des ATPases- Ca^{2+} , - Na^+/K^+ et - H^+ , et sont dépourvues de domaines de fixation aux métaux à leurs extrémités N-terminales. Certaines d'entre elles, comme l'ATPase- Na^+/K^+ nécessite la présence d'une autre sous-unité pour leur fonctionnement et leur régulation.

3.4.3. Les ATPases de type P3

Les ATPases de type P3 se réduisent aux ATPases- K^+ qui permettent un influx de potassium dans la cellule procaryote sous certaines conditions de stress (Altendorf et coll. 1998). Les prédictions de topologie indiquent que ces ATPases atypiques seraient constituées de sept domaines transmembranaires seulement et ne seraient pas fonctionnelles sans la présence d'autres protéines (Lutsenko et Kaplan 1995).

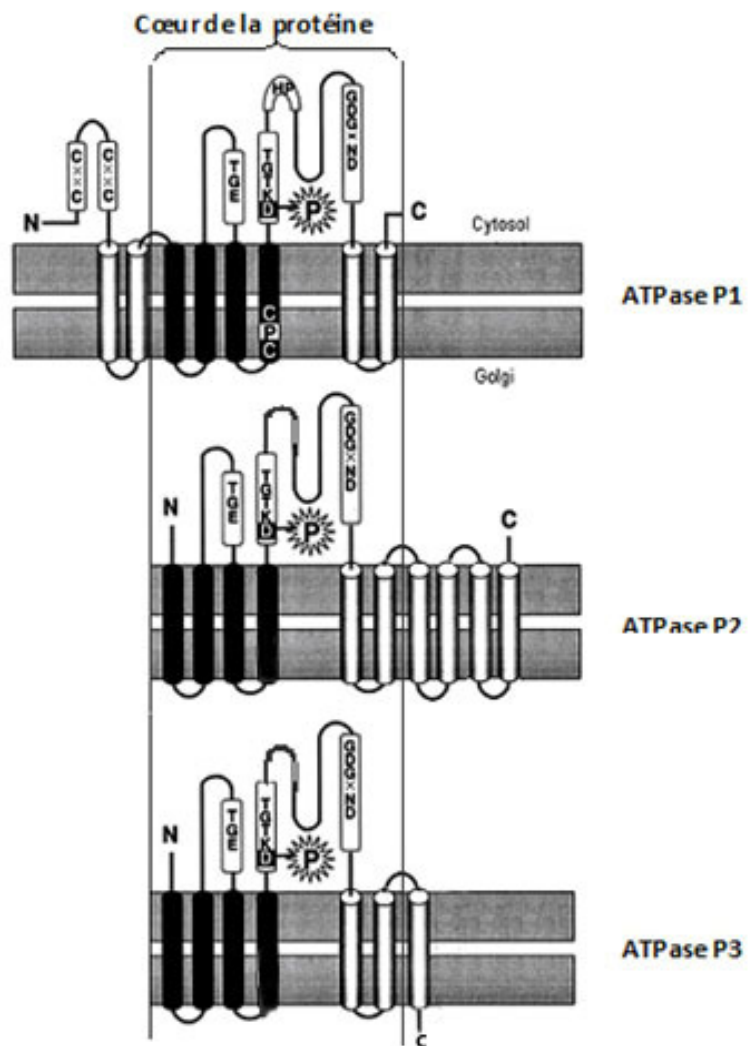


Figure I.3.5 : Classification des ATPases de type P en trois catégories (P1, P2 et P3) selon (Lutsenko et Kaplan 1995)

4. Les ATPases à cuivre

Les ATPases à cuivre ont des caractéristiques conservées qui ne sont pas présentes dans les autres ATPases de type P. Elles présentent des motifs de liaison aux métaux mous dans leur région N-terminale ou C-terminale riches en histidines ou en cystéines, des motifs intra-membranaires de liaison spécifique au cuivre et une grande boucle cytosolique présentant des motifs originaux.

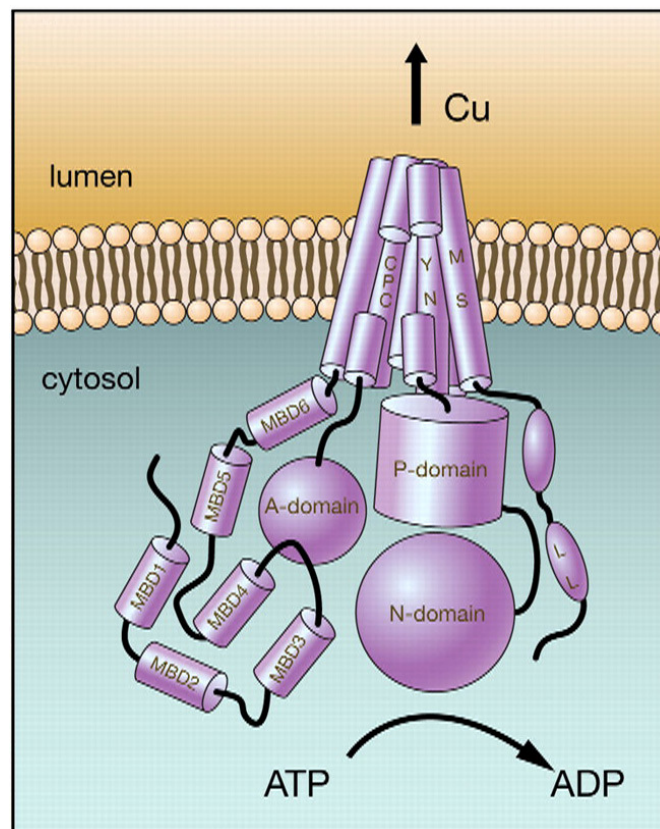


Figure I.4.1 : Représentation schématique de la structure et des caractéristiques de l'ATPase cuivre humaine ATP7B (d'après (Lutsenko et coll. 2007)).

Au cours de ce chapitre ces différents éléments seront abordés d'un point de vue strictement fonctionnel. Les aspects de localisation étant d'une importance particulière pour cette thèse, ils feront l'objet d'un chapitre détaillé à la suite de celui-ci.

4.1. Tour d'horizon des ATPases à cuivre

Les ATPases de type P1 à cuivre sont des acteurs majeurs de l'homéostasie cellulaire du cuivre chez tous les organismes, des bactéries aux mammifères.

L'opéron Cop chez *Enterococcus hirae* :

Le maintien de l'homéostasie du cuivre chez le procaryote *E. hirae* repose sur la présence d'un opéron : l'opéron Cop (figure I.4.2).

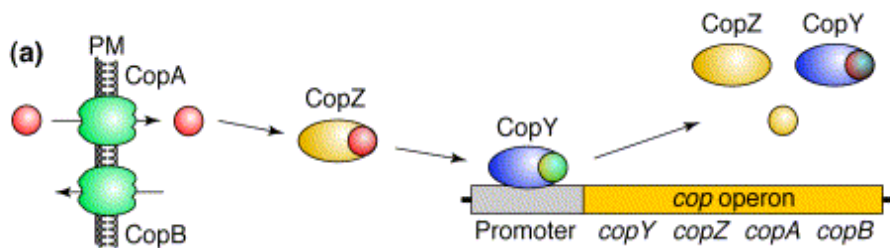


Figure I.4.2 : Schématisation de l'opéron Cop (d'après (Harrison et coll. 2000))

Cet opéron comporte les gènes de quatre protéines : les ATPases CopA et CopB impliquées dans l'import pour CopA et l'export de cuivre pour CopB, CopY un répresseur transcriptionnel sensible au cuivre et CopZ une métallo-chaperonne responsable du convoyage du cuivre (Odermatt et coll. 1994). CopZ est un homologue structural d'Atx1 qui joue un rôle central dans l'homéostasie du cuivre chez *E. hirae*. Elle serait impliquée dans la réception du cuivre apporté par CopA en situation de carence, alors qu'en situation de surcharge, elle délivre le cuivre à CopY, permettant ainsi l'expression de CopB et donc l'export de cuivre. La principale différence entre CopA et CopB se situe au niveau de leur domaine N-terminal; celui de CopA est un homologue structural de CopZ alors que CopB possède un domaine N-terminal riche en histidines. Des homologues de CopA impliqués dans l'import de cuivre ont été mis en évidence dans la membrane plasmique et la membrane des thylakoïdes de *Synechocystis* (Tottey et coll. 2001), tandis que d'autres comme celle d'*Helicobacter pylori* ou d'*E. coli* sont impliquées dans l'export de cuivre (Ge et Taylor 1996; Rensing et coll. 2000).

Les ATPases à cuivre des plantes :

Les plantes diffèrent des autres organismes par la présence de nombreuses ATPases de type P1 de sélectivités ioniques diverses (figure I.4.3). Chez *Arabidopsis thaliana* huit ATPases de type P1 (HMA pour Heavy Metal ATPase) ont été mises en évidence dont trois sont des ATPases à métaux mous divalents et cinq sont des ATPases à cuivre (HMA1 et HMA5-8) (Williams et Mills 2005).

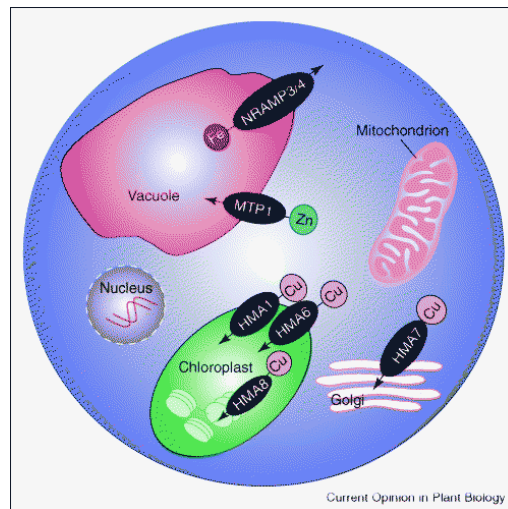


Figure I.4.3 : Distribution des ATPases à cuivre dans une cellule végétale (d'après (Colangelo et Gueriot 2006)).

Le cuivre est un micro-élément essentiel de la photosynthèse où il sert de cofacteur dans la chaîne de transfert d'électron. Ainsi HMA1 et HMA6 sont responsables de l'approvisionnement du stroma des chloroplastes en cuivre (Tabata et coll. 1997) et HMA8 le délivre dans le lumen des thylakoïdes (Shikanai et coll. 2003). HMA7 est localisée dans un compartiment post golgien (Hirayama et coll. 1999) où elle délivre le cuivre notamment au récepteur à l'éthylène, une hormone impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme certaines étapes de la floraison ou la maturation des fruits. Enfin HMA5 est induite au niveau des racines et sa délétion rend la plante hypersensible au cuivre (Andrés-Colás et coll. 2006). HMA5 serait donc impliquée dans la détoxification du cuivre par les racines.

4.2. Le site de transport intra-membranaire du cuivre

Le premier motif intra-membranaire identifié fut le motif CPx dans le sixième passage transmembranaire (TM6). En effet ce motif est très conservé parmi les ATPases à métaux mous. L'acide aminé x est le plus souvent une cystéine, comme dans Ccc2, l'ATPase de la

levure ou dans les ATPases humaines. Dans les ATPases à domaine N-terminal riche en histidines, le CPx devient CPH comme dans le cas de l'ATPase CopB d'*E. hirae* (Odermatt et coll. 1993). De nombreuses expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la mutation de l'un de ces acides aminés en alanine (CAC) ou en sérine (SPS, SPC, CPS) inhibait totalement le transport du cuivre par l'ATPase (Hung et coll. 1997; Forbes et Cox 1998; Lowe et coll. 2004).

Depuis lors d'autres motifs ont été mis en évidence dans les hélices transmembranaires. L'analyse des séquences des ATPases à cuivre a pointé une séquence conservée dans TM7 et TM8, $Nx_6YNx_4Px_{5,25}Px_6MxxSSxxVxx[NS]$ (Argüello 2003). L'étude par mutagenèse dirigée de cette séquence chez CopA d'*Archeoglobus fulgidus* montre l'importance de quatre de ces acides aminés conservés pour le transport du cuivre (Mandal et coll. 2004). En effet les mutations des acides aminés Y682 et N683 de TM7 et M711 et S715 de TM8 ont pour effet d'inhiber la phosphorylation de l'ATPase. Ces acides aminés participeraient à la coordination du cuivre lors du passage au travers de la membrane. Il est d'ailleurs intéressant de noter que la mutation responsable du phénotype des souris « toxic milk », modèle murin de la maladie de Wilson est due au remplacement de la méthionine conservée dans TM8 par une valine (La Fontaine et coll. 1998b; Voskoboinik et coll. 2001a).

4.3. Le domaine N-terminal

L'extrémité N-terminale de ces ATPases est constituée d'un nombre variable de domaines de liaison aux métaux (MBD = Metal Binding Domain). L'importance de cette région est soulignée par le fait que le nombre de MBD augmente avec la complexité des organismes. Ainsi, de un ou deux chez les organismes unicellulaires, il atteint six pour les ATPases de mammifères (figure I.4.1).

La majorité des ATPases à cuivre présente des MBD avec des motifs de liaison du cuivre très conservés du type CxxC (Arnesano et coll. 2002; Argüello et coll. 2007). Cependant quelques unes de ces ATPases présentent des domaines N-terminaux riches en histidines. On peut citer CopB d'*E. hirae* et d'*Archeoglobus fulgidus*, CtrA3 d'*Aquifex aeolicus* ou encore HMA1 d'*Arabidopsis thaliana* (Odermatt et coll. 1993; Argüello et coll. 2003; Seigneurin-Berny et coll. 2006; Chintalapati et coll. 2008). Si ces domaines riches en histidines jouent probablement des rôles similaires à ceux des MBD du type CxxC (Manacelli et coll. 2003), leurs caractéristiques et leurs structures restent à préciser.

Dans cette partie nous nous attacherons donc à décrire la structure et la fonction des MBD ayant des motifs de liaison au cuivre du type CxxC.

4.3.1. Structure du domaine N-terminal

En 2002, Arnesano et coll. ont réalisé une étude comparative des séquences et des structures disponibles des domaines N-terminaux des ATPases de type P1 (Arnesano et coll. 2002). L'analyse de 116 séquences de MBD provenant de 52 protéines de divers organismes (archéobactéries, bactéries, eucaryotes) montre que les N-terminaux sont organisés en modules d'environ 70 acides aminés. L'espacement entre les différents MBD au sein d'un domaine N-terminal est variable, allant de 10 à 90 acides aminés. Par contre, l'identité entre les MBD est élevée, plus de 50 %, même entre MBD d'organismes différents. Le motif de liaison des métaux est lui aussi très fortement conservé, GM(H/T)CxxC.

Depuis la structure de Mnk4, le quatrième MBD du domaine N-terminal de l'ATPase de Menkes (Gitschier et coll. 1998), la plupart des MBD des différentes ATPases ont été étudiés par RMN au laboratoire de Lucia Banci et Ivano Bertini en Italie. Il ressort de cette étude systématique que leur repliement est similaire à celui des métallo-chaperonnes à cuivre de la famille d'Atx1, soit un repliement $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ de type ferredoxine. Citons pour mémoire l'étude de la structure de Ccc2a, le premier MBD de Ccc2 (Banci et coll. 2001).

4.3.2. Domaine N-terminal et transfert du cuivre

Le rôle premier du domaine N-terminal des ATPases à cuivre est la réception du métal convoyé par la métallo-chaperonne. Ce rôle a été suggéré pour la première fois lorsque Lin et coll. en 1997 ont mis en évidence *in vivo* l'implication de la métallo-chaperonne Atx1 dans la fourniture du cuivre à Ccc2 (Lin et coll. 1997). La même année, Pufhal et coll. montraient par la technique du double hybride, l'interaction directe entre Atx1 et le domaine N-terminal de Ccc2 (Pufahl et coll. 1997). Depuis lors, les interactions et le transfert du cuivre entre les MBD et leur métallo-chaperonne ont été largement étudiés, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

Quelle est l'origine de la reconnaissance entre la métallo-chaperonne et le domaine N-terminal de l'ATPase ?

La modélisation des surfaces de potentiel électrostatique des métallo-chaperonnes d'une part et des MBD des ATPases d'autre part, issue des structures obtenues par RMN, indique une complémentarité de surface entre les chaperonnes et leur MBD cible. Ainsi un regroupement de sept lysines forme une région de potentiel positif sur Atx1 qui pourrait favoriser l'interaction avec une région riche en acides aminés négativement chargés sur Ccc2a, le premier MBD de Ccc2 (figure I.4.4) (Arnesano et coll. 2001a). La technique du double hybride associée à la mutagenèse dirigée a notamment permis de confirmer l'importance des lysines 24, 28 et 65 dans le transfert du cuivre entre Atx1 et Ccc2 (Portnoy et coll. 1999). Des études similaires des MBD de CopA et de la métallo-chaperonne CopZ, toutes deux issues de *Bacillus subtilis*, suggèrent également des interactions électrostatiques, bien que les polarités des surfaces de potentiels électrostatiques soient inversées (Banci et coll. 2003).

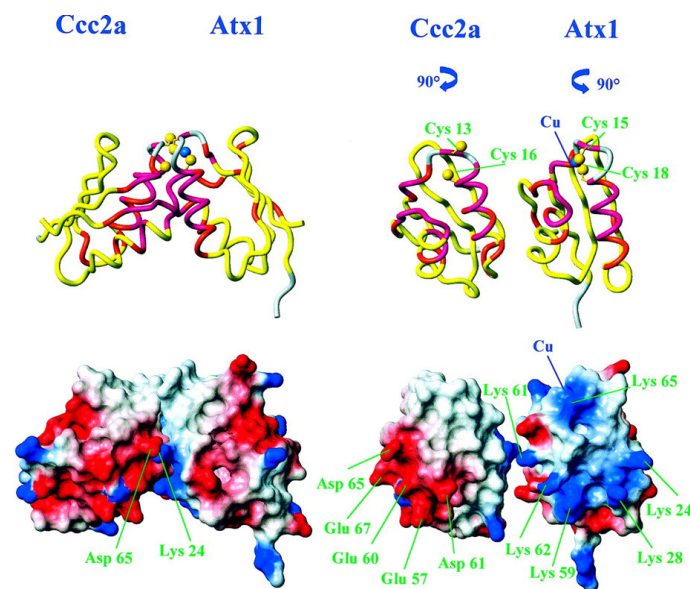


Figure I.4.4 : Modèle structural du complexe Atx1-Ccc2a (d'après (Arnesano et coll. 2001a)).

Cependant quelle que soit l'adéquation de ces surfaces électrostatiques, des données obtenues *in vitro* et *in vivo* relativisent leur importance. Ainsi la présence du cuivre est indispensable à la formation du complexe métallo-chaperonne/MBD *in vitro* (Hamza et coll. 1999 ; Banci et coll. 2006). Sur colonne d'affinité GST, l'immunoprécipitation du domaine N-terminal d'ATP7B ou ATP7A par Atox1 dépend de la présence des cystéines du motif CxxC de la métallo-chaperonne et leur mutation en sérine abolit l'interaction (Hamza et coll. 1999). Par ailleurs, les études RMN des interactions entre Ccc2a et Atx1 en présence de Cu(I)

avec des protéines sauvages ou des protéines dont les cystéines du motif CxxC ont été changées en sérine (Arnesano et coll. 2001a ; Banci et coll. 2006), ont permis de préciser le modèle d'échange de liaison entre les cystéines d'Atx1 et celles de Ccc2a (figure I.4.5) initialement proposé (Pufahl et coll. 1997).

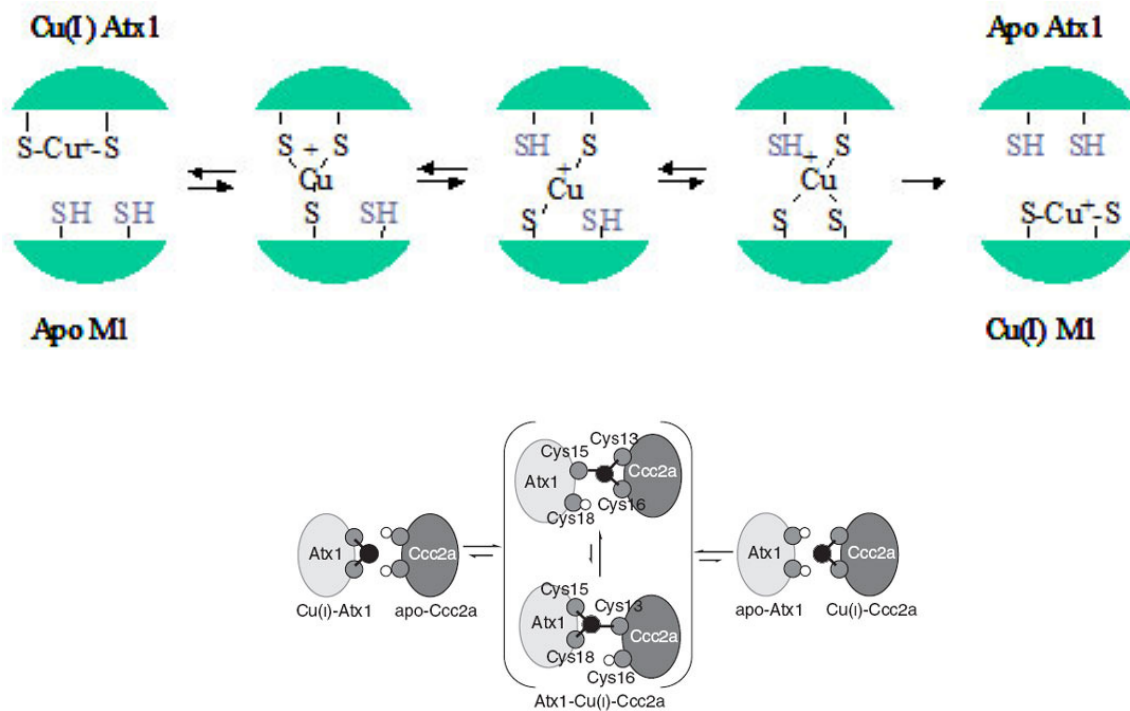


Figure I.4.5 : Représentations schématiques du transfert du cuivre entre Atx1 et Ccc2a
Figure du haut d'après (Pufahl et coll. 1997) **figure du bas** d'après (Banci et coll. 2006)

In vivo, diverses métallo-chaperonnes et MBD exprimés isolément parviennent à remplacer Atx1 dans une levure dont le gène *ATX1* a été invalidé et ce remplacement fonctionnel se produit malgré des surfaces de potentiel électrostatique de signes opposés (Morin et coll. 2005). Ainsi, dans cette expérience, l'attraction électrostatique ne semble pas être un facteur déterminant de la reconnaissance entre la métallo-chaperonne et sa cible. Néanmoins Isabelle Morin a montré dans sa thèse, que ces métallo-chaperonnes étaient beaucoup moins efficaces qu'Atx1, relançant ainsi la problématique des déterminants de la reconnaissance protéine-protéine entre la chaperonne et son ATPase cible (Morin 2005).

Transfert du cuivre et MBD multiples.

Le rôle des différents MBD dans le transfert du cuivre par la protéine est encore mal compris. En effet, *in vitro* l'activité ATPase d'ATP7A (figure I.4.1) est réduite de moitié

lorsque les cystéines des motifs CxxC des MBD ont été mutées en sérines qui les rendent incapables de lier le cuivre (Voskoboinik et coll. 1999). Les mêmes mutations pratiquées sur les MBD de Ccc2 inhibent la phosphorylation auto-catalytique de la protéine *in vitro*, et *in vivo* la protéine modifiée ne complémente plus le phénotype associé à la délétion de CCC2. Cependant, la défaillance de ce mutant ne serait pas directement due à l'incapacité de ses MBD de lier le cuivre. En effet la troncature des MBD de Ccc2 ne modifie pas l'activité de phosphorylation auto-catalytique *in vitro* (Morin 2005). Ainsi, *in vitro*, les MBD ne sont pas nécessaires à la phosphorylation auto-catalytique de l'ATPase qui parvient à fixer le cuivre disponible dans le tampon.

L'utilisation d'un test de complémentation phénotypique chez une levure dont les gènes CCC2 et ATX1 ont été conjointement inactivés a permis d'étudier le transfert du cuivre à l'ATPase dans un contexte cellulaire. Ainsi la protéine Ccc2 tronquée de ses MBD est incapable de recevoir le cuivre d'Atx1, mais le transfert du cuivre est rétabli si l'un de ses MBD est apporté en trans sous forme cytosolique indépendante (Morin 2005). Ce résultat met en évidence le rôle primordial des MBD dans l'acquisition du cuivre par la protéine dans le cytoplasme. Ce même test de complémentation a été utilisé sur une souche de levure dont seul le gène CCC2 a été inactivé pour étudier le rôle des 6 MBD d'ATP7B et d'ATP7A. Dans ces expériences, les auteurs supposent que la forte homologie de séquence entre Atox1 (l'homologue humain d'Atx1) et Atx1 permet à ce dernier de remplir le rôle d'Atox1. Il résulte de ces expériences que les deux protéines ATP7A et ATP7B sont capables de remplacer Ccc2 dans la levure et que cette propriété est abolie par la substitution des 12 cystéines des MBD par des sérines (Payne et Gitlin 1998; Forbes et coll. 1999). Cependant, les MBD ne semblent pas avoir le même poids dans la capacité des deux protéines à remplacer Ccc2 : ATP7A est fonctionnelle si seules les cystéines des trois premiers MBD sont modifiées, alors qu'ATP7B supporte les modifications des cystéines des cinq premiers MBD (Iida et coll. 1998; Voskoboinik et coll. 2001b). Ainsi malgré de fortes homologies de séquences et de structure, les différents MBD ne sont pas équivalents.

Les études *in vitro* d'interaction avec Atox1 et de transfert du cuivre sur le domaine N-terminal d'ATP7A et ATP7B indiquent une spécialisation de la fonction des différents MBD. Par les techniques du double hybride ou des colonnes d'affinité, des interactions sont mises en évidence en présence de cuivre entre Atox1 et MBD1 à MBD4 pour la protéine de Wilson ou MBD2 à MBD6 pour la protéine de Menkes (Larin et coll. 1999; Strausak et coll. 2003; van Dongen et coll. 2004). L'étude du transfert du cuivre a été plus poussée pour la

protéine de Wilson. L'étude biochimique d'ATP7B, surexprimée dans des cellules *Sf9*, montre une activité ATPase qui dépend de la présence de cuivre dans le milieu et qui peut s'évaluer par la phosphorylation du site catalytique (Tsivkovskii et coll. 2002). La phosphorylation d'ATP7B est activée par la présence d'Atox1 comme unique source de cuivre (Walker et coll. 2002). Cette activation par Atox1 disparaît lorsque les cystéines du motif CxxC de MBD2 sont changées en sérines, alors que la présence de cuivre dans le milieu active encore ATP7B (Walker et coll. 2004). La RMN en solution montre que l'interaction entre Atox1 et MBD4 est plus forte que celle que l'on observe entre Atox1 et MBD2 (Achila et coll. 2006). Enfin, un changement de conformation est induit par la simple liaison du cuivre sur le domaine N-terminal d'ATP7B (DiDonato et coll. 2000). Il ressort de ces données un modèle de transfert du cuivre dans lequel Atox1 activerait l'ATPase en transférant son cuivre à MBD2, ce qui entraînerait un changement de conformation permettant à Atox1 de délivrer le cuivre à MBD4. Celui-ci ne transférerait pas le cuivre directement au reste de la protéine, mais plutôt à MBD5 ou MBD6. En effet deux mutations responsables de la maladie de Wilson, L492S dans MBD5 et G591D dans MBD6 d'ATP7B, ont un effet délétère sur l'interaction *in vitro* du domaine N-terminal de l'ATPase avec Atox1 (Hamza et coll. 1999). De plus, l'étude de l'ensemble MBD5-MBD6 montre que ces deux mutations ont un effet déstabilisant sur la structure de ces MBD (Achila et coll. 2006).

D'autre part, il a été montré que le domaine N-terminal d'ATP7B interagit avec la grande boucle cytosolique et que cette interaction disparaît en présence de cuivre, favorisant ainsi l'activité ATPase (Tsivkovskii et coll. 2001; Huster et Lutsenko 2003). Enfin, la question du transfert du cuivre des MBD au site de transport intra-membranaire reste ouverte à l'heure actuelle. Si les MBD de Ccc2 peuvent réaliser ce transfert, les métallo-chaperonnes en sont incapables (Morin 2005). Deux hypothèses sont imaginables. La première prend en compte les problèmes stériques liés à un transfert direct du cuivre des MBDs au site intra-membranaire et postule l'existence d'un site intermédiaire de transport (Lutsenko et coll. 2007). L'autre suppose une interaction directe entre les MBD et le site de transport intra-membranaire.

4.3.3. Domaine N-terminal et sélectivité ionique.

Les motifs du type C_x_nC sont des motifs connus pour leur affinité pour les métaux de transition et de nombreuses protéines à métaux présentent de tels motifs. En effet de

nombreux métaux de transition tels que le cuivre, le fer, l'argent, le mercure, le cadmium... sont des acides mou de Lewis. Ils interagissent donc favorablement avec les bases molles de Lewis que sont les thiolates des cystéines. De ce fait la sélectivité d'une protéine pour un métal mou n'est pas assurée par le motif Cx_nC . Ceci se vérifie avec le motif GM(H/T)CxxC très conservé des ATPases de type P1, que ces ATPases soient spécifiques du Cu(I) ou du Cd(II).

La sélectivité ionique de ces domaines de liaison aux métaux lourds a été étudiée *in vitro*. Par exemple, la région N-terminale de l'ATPase de Wilson peut lier le Cu(I) avec une stoechiométrie de 6:1 (DiDonato et coll. 1999), mais aussi le Zn(II) et avec la même stoechiométrie (DiDonato et coll. 2002). Il a également été montré que ce domaine pouvait lier divers métaux avec un ordre d'affinité $Cu(I) \gg Zn(II) > Ni(II) > Co(II)$ (DiDonato et coll. 1999). Le domaine N-terminal de la protéine de Menkes lie lui aussi le cuivre avec une stoechiométrie de 6:1 (Jensen et coll. 1999) et a aussi la capacité de lier l'Ag(I) (Gitschier et coll. 1998). Dans le même ordre d'idée, l'étude d'un petit peptide comportant le motif GMTCSGC de la boucle complexante d'Atx1 a montré que la sélectivité de ce motif est $Hg(II) > Cu(I) \gg Pb(II) > Cd(II) > Zn(II)$ (Sénèque et coll. 2004; Rousselot-Pailley et coll. 2006).

La protéine ZntA de *E. coli* est une ATPase à zinc (Beard et coll. 1997). Après substitution de son domaine N-terminal par celui de la protéine de Wilson, donc d'une ATPase à cuivre, la protéine chimérique présente la même sélectivité ionique que la protéine sauvage (Hou et coll. 2001). Enfin *in vivo*, MerP, protéine de l'opéron mer qui participe à la détoxification du mercure (Lund et Brown 1987) et Ntk, MBD de l'ATPase à cadmium qui participe à la détoxification du cadmium (Lebrun et coll. 1994), sont capables de rétablir le transfert du cuivre dans une levure dépourvue du gène *ATX1* (Morin et coll. 2005). Autrement dit, dans le cytosol d'une levure, MerP et Ntk peuvent jouer le rôle d'Atx1.

Il est donc raisonnable de considérer que ce n'est pas leur domaine N-terminal qui détermine la sélectivité ionique des ATPases de type P1. Les acides aminés des segments transmembranaires assurant le passage de l'ion transporté seraient le facteur clé déterminant la sélectivité ionique de la protéine.

4.3.4. Domaine N-terminal et régulation

L'augmentation du nombre de MBD avec la complexification des organismes pose la question des rôles secondaires de ces MBD dans la fonction de l'ATPase au sein de la cellule.

Ainsi, une interaction a tout d'abord été détectée, *in vitro*, entre la région N-terminale de l'ATPase de Wilson et la grande boucle cytoplasmique (Tsivkovskii et coll. 2001). Cette interaction est modulée par la présence de cuivre et pourrait être à l'origine de phénomènes de régulation *in vivo*.

Le cuivre, convoyé par la métallo-chaperonne Atox1 et délivré à un MBD du domaine N-terminal de l'ATPase de Wilson, induirait un changement de conformation, qui couperait l'interaction avec la grande boucle de l'ATPase (Huster et Lutsenko 2003). Ainsi, le réarrangement conformationnel observé lors de la liaison du cuivre sur la région N-terminale de l'ATPase pourrait initier la formation de l'intermédiaire phosphorylé et participerait à l'activité de l'ATPase *in vivo*.

La troncature de la région N-terminale d'autres ATPases de type P1 augmente l'affinité apparente de la protéine pour le métal transporté. Par exemple, la protéine CadA de *Listeria monocytogenes* tronquée de sa région N-terminale présente une affinité plus élevée pour le cadmium que la protéine entière. Cette mesure révèle l'affinité apparente des sites intra-membranaires de liaison du cadmium (Bal et coll. 2001). Ainsi, la moins bonne affinité de la protéine CadA entière peut s'expliquer par l'intervention d'un autre site de liaison du cadmium dans le MBD. Ce MBD avec une plus faible affinité apparente, modulerait l'activation de CadA par le cadmium. Le remplacement des cystéines du domaine N-terminal par des alanines a le même effet. Il a ainsi été montré que MBD5 et MBD6 de l'ATPase de Wilson étaient impliqués dans le maintien de l'enzyme dans un état de moindre affinité pour le cuivre (Huster et Lutsenko 2003). Cet effet est attribué à l'interaction du domaine N-terminal par l'intermédiaire des cystéines des motifs CxxC avec la grande boucle de l'ATPase. L'élimination des groupements SH des cystéines altérerait cette interaction, ce qui aurait comme effet d'augmenter l'affinité apparente de la protéine pour le cuivre.

4.4. Le domaine nucléotidique de la grande boucle cytoplasmique.

Le motif histidine-proline (HP) de la grande boucle cytoplasmique est présent chez toutes les ATPases à métaux lourds. Cette histidine est l'acide aminé le plus fréquemment muté chez les patients atteints de la maladie de Wilson. Chez ces patients la mutation la plus fréquente est le remplacement de l'histidine en glutamine (Tanzi et coll. 1993). Des tests de complémentation et des études fonctionnelles *in vitro* réalisées sur des mutants d'ATP7B (Hung et coll. 1997; Shah et coll. 1997; Iida et coll. 1998), CopB d'*E. hirae* (Bissig et coll.

2001) ou ZntA d'*E. coli* (Okkeri et Haltia 1999) ont confirmé le rôle essentiel de ce motif. Les études *in vitro* sur le domaine nucléotidique produit sous forme soluble permettent de nous éclairer sur le rôle de ce motif (Dmitriev et coll. 2006).

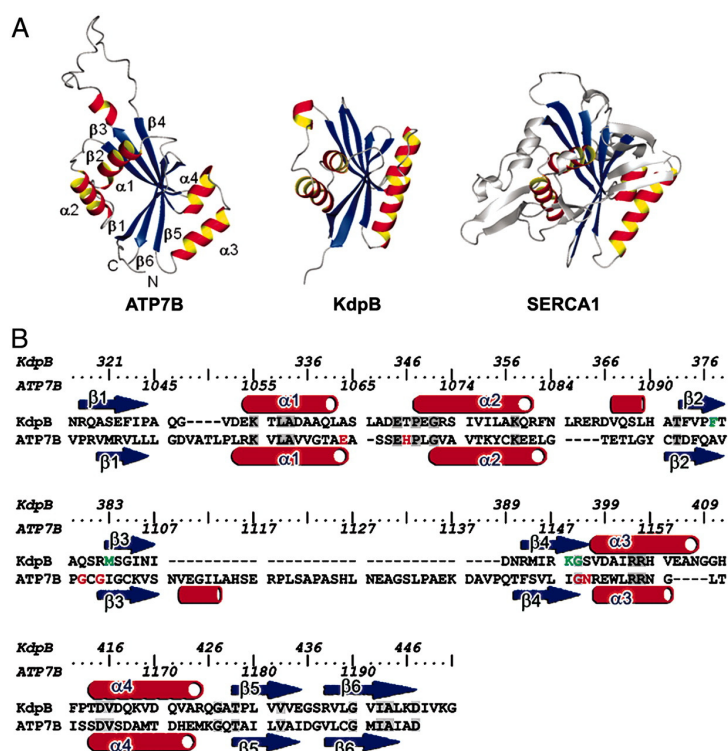


Figure I.4.6 : Comparaison des structures et séquences entre les domaines nucléotidiques d'ATP7B, KdpB et Serca1a (d'après (Dmitriev et coll. 2006))

Si le domaine P de la grande boucle des ATPases de type P est très conservé, ce n'est pas le cas du domaine N qui présente des divergences de séquence importantes, notamment au niveau des acides aminés responsables de la liaison de l'ATP (Morgan et coll. 2004). Ces différences de séquence se traduisent au niveau de l'affinité pour l'ATP du domaine N isolé. Ainsi, l'affinité du domaine N isolé des ATPases- Na^+/K^+ et $-\text{Ca}^{2+}$ est de 1-5 mM (Champeil et coll. 1998; Hilge et coll. 2003), alors que dans le cas d'ATP7B, l'affinité est de l'ordre de 80 μM (Morgan et coll. 2004).

La résolution de la structure des domaines N d'ATP7B et de CopA d'*A. fulgidus* a permis de mettre en évidence la grande similarité de la structure de ce domaine avec celle des ATPases- Na^+/K^+ et $-\text{Ca}^{2+}$, malgré une séquence primaire très différente (Dmitriev et coll. 2006; Sazinsky et coll. 2006). Ainsi le domaine N des ATPases de type P connu présente le même cœur en feuillet β antiparallèle bordé par des hélices α (figure I.4.6).

La résolution de la structure du domaine N d'ATP7B en présence d'ATP a permis de montrer que la liaison de l'ATP affecte environ 20 % des résidus de ce domaine, alors que

cette liaison n'a que peu d'effet sur le domaine N des ATPases de type P2 (Hilge et coll. 2003; Haupt et coll. 2004). Cette curiosité se retrouve également dans les acides aminés responsables de la liaison de l'ATP qui diffèrent entre les ATPases de type P2 et les ATPases à cuivre. De plus, certains de ces acides aminés sont connus pour être essentiels, puisque leurs modifications peuvent être à l'origine des maladies de Wilson ou Menkes. Ainsi chez ATP7B les mutations E1064A, H1069Q (du motif HP), C1104F et R1151H provoquent *in vitro* une perte d'affinité pour l'ATP corrélée à un dysfonctionnement de la protéine. D'autres mutations ponctuelles comme G1099S, G1101K ou I1102P situées à proximité de la molécule d'ATP peuvent aussi affecter sa fixation. Ce lien maladie-mutation affectant l'affinité pour l'ATP semble une spécificité des ATPases à cuivre.

4.5. L'ATPase à cuivre de *Saccharomyces cerevisiae* Ccc2

4.5.1. La découverte de Ccc2

Le gène de Ccc2 a été découvert en 1995 comme suppresseur du phénotype d'une souche *csg1Δ* (Calcium Sensitive Growth), souche hypersensible au calcium et déficiente dans la mannosylation des sphingolipides (Fu et coll. 1995). Ce phénotype est à l'origine du nom de Ccc2 pour Ca^{2+} -sensitive Cross Complementation. Situé sur le chromosome IV, *CCC2* est un gène constitué de 3015 pb codant pour une protéine de 1004 acides aminés.

4.5.2. Prédiction de structure de Ccc2

La topologie de Ccc2 peut être prédite sur la base des alignements de séquence des ATPases de type P1 (Axelsen et Palmgren 1998). Ccc2 possède l'ensemble des caractéristiques de ces ATPases. Son domaine N-terminal comporte deux domaines de liaison aux métaux lourds MBD1 et MBD2 dont la structure est similaire à celle des autres MBD. La prédiction de structure de Ccc2 comporte huit hélices transmembranaires : les quatre premières, TM1-TM4, sont situées en amont de la petite boucle cytoplasmique contenant le motif TGE, les hélices TM5 et TM6 séparent la petite de la grande boucle cytoplasmique qui elle contient les motifs caractéristiques des ATPases de type P1 : DKTGT, HP et GDGINDIP ; enfin les hélices TM7 et TM8 concluent la protéine en C-terminal.

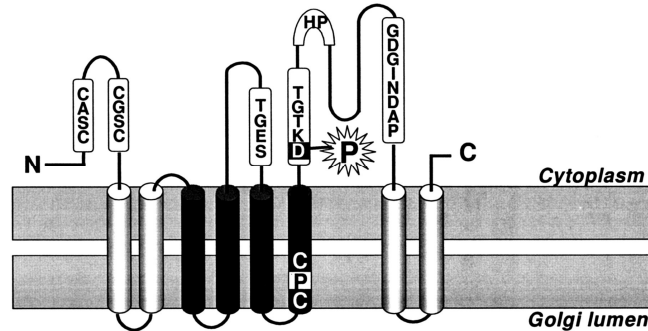


Figure I.4.7 : Prédiction de structure et caractéristiques l'ATPase de *S. cerevisiae* Ccc2 (d'après (Lowe et coll. 2004)).

4.5.3. La fonction de Ccc2

Ccc2 est localisée dans le réseau trans-golgien (ou TGN pour Trans Golgi Network), un compartiment postérieur au Golgi dans la voie sécrétoire et qui précède les compartiments endosomaux (Yuan et coll. 1997). Son rôle est de transférer le cuivre cytosolique dans la lumière du réseau trans-golgien en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Le cuivre ainsi transféré permet l'activation des enzymes à cuivre néo-synthétisées dans la voie sécrétoire. Ainsi, Ccc2 intervient dans les voies de synthèse des céramides (Beeler et coll. 1997; Swain et coll. 2002) et dans l'import de fer de haute affinité (Yuan et coll. 1995). En effet, l'oxydase à cuivre Fet3 forme avec la perméase Ftr1 le complexe d'import de fer à haute affinité et l'inactivation de ce complexe augmente la sensibilité des levures à une carence en fer. Ainsi Ccc2 est un élément clef de l'imbrication de l'homéostasie du cuivre et du fer. L'invalidation du gène *CCC2* ou du gène de sa chaperonne *ATX1* entraîne un déficit en cuivre dans la voie sécrétoire qui n'est alors plus capable d'activer le complexe Fet3/Ftr1 responsable de l'import du fer à haute affinité. Le phénotype qui découle de la rupture de la voie Ccc2 – Atx1 a été mis à profit lors de la thèse d'Isabelle Morin (Morin 2005) pour étudier les interactions entre l'ATPase et sa chaperonne. Isabelle a ainsi pu montrer *in vivo* que (i) le transfert du cuivre d'Atx1 vers MBD1 ou MBD2 rétablit la voie Atx1-Ccc2 avec la même efficacité, (ii) Atx1 ne peut transférer le cuivre à Ccc2 si Ccc2 ne comporte pas de MBD fonctionnel, (iii) un MBD amené en trans sous forme cytosolique et indépendant de

Ccc2 est capable de transférer le cuivre à Ccc1. Ces résultats suggèrent des différences fonctionnelles entre Atx1 et les MBD, malgré leur forte identité de structure et de séquence. De plus, ils indiquent que le cuivre des MBD est directement transféré au reste de la protéine par les MBD, le site recevant le cuivre des MBD restant à identifier.

L'activation du complexe Fet3/Ftr1 nécessite également la présence des protéines Tfp1 et Gef1 actives (Gaxiola et coll. 1998). Tfp1 est une sous-unité de Vma1, l'ATPase proton de la vacuole et Gef1, un canal chlore. L'implication de ces deux protéines est probablement indirecte. Vma1 permettrait l'acidification du lumen des vésicules du TGN et Gef1 assurerait le maintien du potentiel de membrane des vésicules par le transport des ions Cl^- comme contre-ions.

4.5.4. La régulation de Ccc2

La régulation de Ccc2 a été peu étudiée. L'analyse du transcriptome en carence ou excès de cuivre ne révèle pas de régulation transcriptionnelle de Ccc2 en réponse à ces variations (Gross et coll. 2000; van Bakel et coll. 2005; Jo et coll. 2008). Cependant, l'analyse du transcriptome d'une souche de levure dont le gène du facteur de transcription Mac1 a été inactivé révèle une augmentation de la transcription de Ccc2 (De Freitas et coll. 2004). Une telle souche peut être considérée comme une souche en carence de cuivre chronique et, de par le rôle du cuivre dans l'import de fer à haute affinité, cette souche est aussi carencée en fer. Or, Aft1, le facteur de transcription qui répond à une carence en fer régule l'expression de Ccc2 (Yamaguchi-Iwai et coll. 1996). Dans une levure souffrant d'une carence en fer, Aft1 se lie sur le promoteur de Ccc2 activant ainsi sa transcription. Il est donc probable que l'activation de la transcription de Ccc2 dans la souche *mac1Δ* soit due à la carence chronique en fer de cette souche (De Freitas et coll. 2004). Renforçant cette hypothèse, cette étude montre que d'autres gènes connus pour être activés par Aft1 sont aussi surexprimés, tel *FET3*, gène de l'oxydase du complexe d'import de fer à haute affinité ou *FIT3*, gène d'une protéine de la paroi impliquée dans la fixation des sidérophores.

Récemment Valverde et coll. (2008) ont étudié la régulation de l'activité catalytique de Ccc2 par la PKA, la protéine kinase dépendante de l'AMPc. Les auteurs observent la phosphorylation de la sérine 258 par la PKA, phosphorylation qui dépend de la présence de cuivre et qui modulerait l'activité de Ccc2.

5. Localisation et trafic intracellulaire des ATPases à cuivre humaines, ATP7A et ATP7B

Les rôles distincts des ATPases cuivre humaines dans l'organisme et leur rôle dual au sein de la cellule, détoxification du cuivre et approvisionnement en cuivre des enzymes lors de la biosynthèse des protéines, impliquent une fine régulation de leur expression tissulaire et de leur localisation intracellulaire. Après avoir brièvement décrit la distribution tissulaire des deux ATPases à cuivre humaines, je m'attacherai au cours de ce chapitre à détailler leur localisation intracellulaire et les facteurs régulant cette localisation.

5.1. Distribution des ATPases humaines dans les tissus de l'organisme

Les symptômes des maladies de Menkes et de Wilson indiquent une expression différenciée de ces deux ATPases dans l'organisme (figure I.2.1). Ainsi les patients atteints de la maladie de Menkes présentent de graves troubles liés à une carence en cuivre de l'organisme. En effet ATP7A, est exprimée dans les cellules de l'épithélium intestinal et possède un rôle crucial dans l'absorption du cuivre alimentaire (Kuo et coll. 1997). Un défaut dans son fonctionnement affecte donc gravement l'approvisionnement de l'organisme en cuivre. Les désordres neurologiques observés sont à la fois dus à cette carence, mais également au rôle d'ATP7A dans le passage de la barrière hémato-encéphalique et dans l'approvisionnement en cuivre des cellules du cerveau (Iwase et coll. 1996; Nishihara et coll. 1998; Qian et coll. 1998). Au contraire, les patients atteints de la maladie de Wilson présentent des symptômes liés à une surcharge en cuivre de leur organisme. Notamment au niveau du foie, organe majeur de la détoxification du cuivre chez les mammifères où seule ATP7B est exprimée (Schaefer et coll. 1999; Huster et coll. 2003). Ces patients présentent également des désordres neurologiques qui semblent plus liés à la surcharge en cuivre du cerveau qu'au rôle d'ATP7B dans le cerveau, bien que ce dernier reste encore à définir avec précision.

D'autres organes co-expriment les deux ATPases. Leurs rôles sont alors distincts et complémentaires dans ces organes. Ainsi dans le placenta, l'expression et la localisation des deux ATPases sont sous contrôle hormonal et parfaitement complémentaire (Hardman et coll. 2007a; Hardman et coll. 2007b), afin de délivrer la bonne quantité de cuivre au fœtus. ATP7B

tient un rôle protecteur en exportant le cuivre dans le sang maternel, alors qu'ATP7A permet de délivrer le cuivre indispensable au développement du fœtus (Camakaris et coll. 1979; Mann et coll. 1980; Hardman et coll. 2004). Au cours du troisième trimestre de grossesse, l'augmentation des besoins en cuivre du fœtus est pourvue par une répression de l'expression d'ATP7B et sa relocalisation dans le réseau trans-golgien d'une part, et une stimulation d'ATP7A par l'insuline et les œstrogènes d'autre part.

5.2. Localisation intracellulaire

La localisation d'ATP7A et ATP7B a été abondamment étudiée dans de nombreux types cellulaires, aussi bien sur des cellules exprimant la protéine endogène qu'après transfection, stable ou transitoire.

5.2.1. Localisation intracellulaire d'ATP7A

L'étude d'ATP7A en condition basale montre une localisation vésiculaire péri nucléaire qui se confond avec la localisation des marqueurs du Golgi et du TGN dans de nombreux types cellulaires, ainsi que sur coupes histologiques (Dierick et coll. 1997; Ambrosini et Mercer 1999; Pascale et coll. 2003; Nyasae et coll. 2007). ATP7A est active dans le TGN et transfère le cuivre aux protéines à cuivre de la voie sécrétoire, telle que la peptidylglycine monooxygénase, la tyrosinase, la lysyl oxydase... (El Meskini et coll. 2003; Steveson et coll. 2003).

Le changement de localisation d'ATP7A en réponse à une augmentation de la concentration en cuivre dans le milieu extracellulaire a été mis en évidence pour la première fois dans des cellules CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary cell) surexprimant la protéine (Camakaris et coll. 1995; Petris et coll. 1996). Dans ces conditions, la protéine est délocalisée à la membrane plasmique des cellules où elle joue le rôle de pompe d'efflux. Les études sur de nombreux types cellulaires montrent que ce déplacement est rapide, puisqu'il est détecté dès 15 min de traitement, réversible, dépendant de l'ATP et indépendant de la synthèse de nouvelles protéines : ce sont les protéines préexistantes qui migrent à la membrane plasmique (Yamaguchi et coll. 1996; Ackland et coll. 1997; Dierick et coll. 1997; La Fontaine et coll. 1998a; Qi et Byers 1998; Francis et coll. 1999).

Dans l'organisme, ATP7A est abondamment exprimée dans les entérocytes, cellules de l'intestin qui réalisent le transport du cuivre de la lumière de l'intestin vers la circulation sanguine. Ces cellules sont polarisées, c'est-à-dire organisées de façon vectorielle avec une membrane apicale face à la lumière de l'intestin et une membrane basolatérale face aux vaisseaux sanguins. Dans ces cellules polarisées, ATP7A migre vers la membrane basolatérale et n'est jamais détecté à la membrane apicale (Greenough et coll. 2004).

Dans la plupart des études, les cellules en culture sont exposées à des concentrations en cuivre de l'ordre de 200 μM . Cependant, à des concentrations plus physiologiques, entre 10 et 20 μM , ATP7A présente une localisation vésiculaire adjacente à la membrane plasmique, mais jamais à la membrane elle-même (Petrus et coll. 1996; Hamza et coll. 2003; Monty et coll. 2005). De plus, une étude récente, portant sur des cultures primaires de l'épithélium intestinal et sur des segments d'intestin de souris transgéniques surexprimant l'ATPase, ne détecte pas ou très peu de protéines à la membrane basolatérale, mais plutôt une localisation dans des vésicules non identifiées à proximité de cette dernière (Nyasae et coll. 2007).

5.2.2. Localisation intracellulaire d'ATP7B

En condition basale de cuivre, ATP7B a été localisée dans le TGN de nombreux types cellulaires, cellules polarisées (HepG2, WIF-B, Hep3B) (Yang et coll. 1997; Harada et coll. 2003; Guo et coll. 2005) ou non polarisés (Hela, HuH7, CHO-K1) (Forbes et Cox 2000; La Fontaine et coll. 2001; Huster et coll. 2003). Contrairement à ATP7A, l'ATPase de Wilson n'a jamais été clairement détectée à la membrane plasmique en présence de cuivre quel que soit le type cellulaire étudié. A 200 μM de cuivre dans le milieu extra-cellulaire, ATP7B est détectée dans des vésicules non caractérisées à proximité de la membrane plasmique. Les études sur des cellules hépatiques polarisées montrent qu'en présence de cuivre, ATP7B se déplace dans des vésicules adjacentes à la membrane apicale et se trouve dans les mêmes membranes que Rab11, protéine connue pour cycliser entre la membrane plasmique et les endosomes (Guo et coll. 2005). Ce résultat concorde avec le rôle de la protéine dans le foie où elle est responsable de la détoxification du cuivre vers la bile. De façon similaire à ATP7A, les études sont la plupart du temps réalisées à des concentrations en cuivre de 200 μM , mais des concentrations de 5 à 10 μM suffisent à déclencher la délocalisation de l'ATPase (van Wassenae-van Hall et coll. 1996; Roelofsen et coll. 2000).

5.2.3. Mécanisme d'excrétion du cuivre intracellulaire.

En excès de cuivre, ATP7A et ATP7B sont majoritairement localisées dans des vésicules adjacentes à la membrane plasmique. Il semble donc que les deux ATPases pompent le cuivre dans ces vésicules et que celui-ci soit ensuite éliminé de la cellule par exocytose (figure I.5.1).

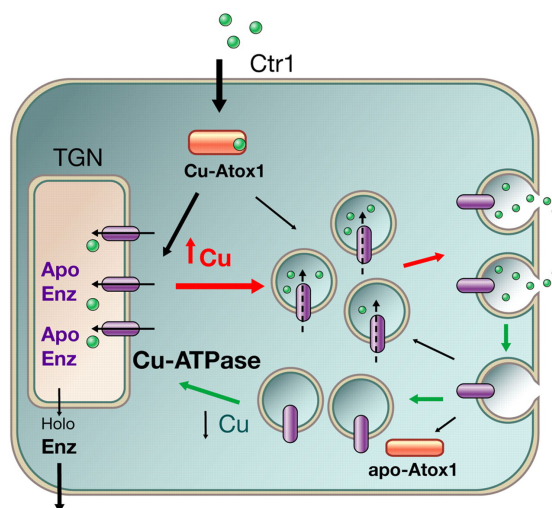


Figure I.5.1 : Localisations et rôles des ATPases cuivre dans les cellules humaines lorsque la concentration extracellulaire en cuivre est basse (flèche verte) ou élevée (flèche rouge) (d'après (Lutsenko et coll. 2007))

La raison pour laquelle un mécanisme d'exocytose est préféré à un pompage direct à la membrane plasmique tel qu'il est observé chez les procaryotes n'est pas clairement établie. Le pH extracellulaire pourrait expliquer en partie cette différence. En effet le pH acide des vésicules induisant la protonation des ligands du cuivre, favoriserait la libération du métal et donc l'activité de ces ATPases. Or les bactéries Gram négatives présentent un tel gradient dans leur périplasme, ce qui n'est pas le cas pour les ATPases humaines dont le milieu extracellulaire est généralement neutre. Cette neutralité serait donc moins favorable à l'activité catalytique d'ATPases insérées dans la membrane plasmique. Les ATPases humaines pomperaient donc le cuivre dans des vésicules acidifiées telles que les endosomes ou les lysosomes avant d'expulser le cuivre de la cellule par exocytose. Cependant cette hypothèse pose la question des ATPases des bactéries Gram positives qui ne possèdent pas de périplasme, mais présentent néanmoins des ATPases à leur membrane plasmique. On pourra citer l'exemple de CadA, l'ATPase à cadmium de *L. monocytogenes*, une bactérie Gram positive, qui permet à la bactérie d'exporter le cadmium hors de son cytoplasme.

La question qui se pose ensuite est de savoir si le cuivre stimule le trafic vers la membrane plasmique ou s'il inhibe le recyclage des ATPases vers le TGN. Peu de données sont disponibles concernant ATP7B, les études s'étant principalement focalisées sur ATP7A dont la localisation transitoire à la membrane plasmique a pu être démontrée (Nyasae et coll. 2007). Afin de résoudre cette question, Petris et Mercer ont inséré une étiquette Myc dans la séquence d'ATP7A, transfecté des cellules CHO et incubé ces cellules en présence d'anticorps anti-myc (Petris et Mercer 1999). En condition basale, le marquage se situe au niveau du TGN indiquant qu'ATP7A cycle en continu entre le TGN et la membrane plasmique. En présence de cuivre, l'internalisation de l'anticorps est encore détectée indiquant que l'endocytose n'est pas inhibée. ATP7A comporte en position C-terminale un motif dileucine connu pour être un signal d'endocytose. Après remplacement des leucines par des alanines, ATP7A est détectée à la membrane plasmique et dans le TGN en condition basale, alors qu'elle disparaît du TGN en excès de cuivre. Ces résultats indiquent que l'ajout de cuivre stimule le trafic de la protéine vers la membrane plasmique. Il est intéressant de noter que la mutation du même signal sur ATP7B n'a pas permis à la même équipe de détecter la protéine à la membrane plasmique des cellules CHO, indiquant clairement des différences dans les mécanismes d'adressage de ces deux protéines (Cater et coll. 2006).

5.3. Les signaux de régulation de la localisation intracellulaire des ATPases à cuivre humaines.

5.3.1. Le rôle du cycle catalytique

L'activité catalytique semble être un élément indispensable au trafic des ATPases dans la cellule. En effet certaines mutations altérant le cycle catalytique d'ATP7A ou ATP7B sont accompagnées d'un défaut de localisation ou de réponse au cuivre de l'ATPase (Ambrosini et Mercer 1999; Forbes et Cox 2000). Ainsi la suppression de l'acide aspartique du motif DKTGT a pour effet de bloquer les ATPases dans le TGN quelle que soit la concentration en cuivre dans le milieu (Petris et coll. 2002; Cater et coll. 2006). Des effets similaires sont obtenus lorsque des acides aminés indispensables au cycle catalytique d'ATP7A sont modifiés, par exemple dans le site de transport intra-membranaire, la 2^{ème} cystéine du motif CPC ou l'asparagine du motif YN de TM7 ou encore l'histidine du motif HP de la grande boucle (Petris et coll. 2002; Voskoboinik et coll. 2003b). *A contrario* la mutation du motif

TGE du domaine A d'ATP7A et ATP7B qui rend ces protéines quasi constitutivement phosphorylées a pour effet de les piéger dans les vésicules adjacentes à la membrane plasmique, en condition basale comme en présence de concentration élevée de cuivre (Petrus et coll. 2002; Cater et coll. 2006). Un lien apparaît donc entre phosphorylation et localisation de ces ATPases. L'étude plus poussée d'ATP7B portant un motif TGE modifié en AAA a permis de mettre en évidence l'existence d'un site de régulation par le cuivre encore non identifié. En effet ce mutant dont la déphosphorylation est fortement ralentie, mais pas totalement inhibée, est toujours capable de revenir à une localisation dans le TGN, à condition que les cellules soient traitées par le BCS, un chélateur spécifique du cuivre. Ce résultat indique que ce mutant est toujours sensible à la concentration extracellulaire en cuivre. Or, la mutation de tous les sites connus de liaison du cuivre en combinaison avec le mutant TGE-AAA ne réverse pas ce phénotype (Cater et coll. 2007).

5.3.2. Le rôle du N-terminal.

Le domaine N-terminal des ATPases à cuivre humaines est constitué de six domaines de liaison aux métaux, les MBD. Comme nous l'avons vu précédemment, les MBD ne sont pas nécessaires au cycle catalytique de ces ATPases *in vitro* (§4.3.2). Les études de localisation des ATPases humaines dans les cellules CHO montrent que leur déplacement sous l'effet de la concentration en cuivre nécessite la présence d'un MBD fonctionnel, qui peut être indifféremment le 5^{ème} ou le 6^{ème}, les autres MBD jouant un rôle dans la régulation de l'ATPase. Ainsi les changements de conformation liés à la fixation du cuivre pourraient servir de signal, de senseur de la concentration en cuivre dans la cellule (DiDonato et coll. 2000). Cependant la délétion ou l'inactivation des quatre premiers MBD est sans effet sur le trafic intracellulaire des ATPases dans les cellules CHO, indiquant qu'ils n'ont pas de rôle dans le trafic de la protéine, alors que la délétion, ou l'inactivation des six MBD inhibe le trafic de la protéine (Goodyer et coll. 1999; Strausak et coll. 1999; Mercer et coll. 2003; Cater et coll. 2004). Mais les tests de fonctionnalité cellulaires de ces mutants indiquent que le cycle catalytique de l'enzyme est altéré. Il est donc difficile de différencier l'effet des modifications du domaine N-terminal sur la localisation de la protéine de l'effet de l'altération du cycle catalytique. Par exemple, la troncature des 63 premiers acides aminés en amont du premier MBD d'ATP7B empêche le déplacement de la protéine normalement induit par le cuivre dans les cellules polarisées WIF-B (Guo et coll. 2005). En absence de ces 63 acides aminés,

ATP7B ne migre plus, même si ses six MBD sont fonctionnels. Et en leur présence, le sixième MBD est suffisant pour permettre la délocalisation de l'ATPase en présence de cuivre. Ce résultat semble indiquer que la présence d'un MBD est nécessaire pour permettre à l'ATPase d'être fonctionnelle, fonctionnalité indispensable à son trafic.

Le domaine N-terminal d'ATP7A est beaucoup plus court en amont du premier MBD que celui d'ATP7B. La séquence cible d'ATP7B n'existe donc pas sur ATP7A, laissant à penser que les machineries du trafic intracellulaire des deux ATPases sont différentes. L'ensemble de ces données ne semble pas indiquer de rôle prépondérant des 6 MBD dans la régulation de la localisation de l'ATPase en fonction de la concentration en cuivre. Les MBD ne seraient donc pas les senseurs de cuivre de la cellule.

5.3.3. Le rôle des phosphorylations par les kinases.

La phosphorylation par des kinases semble être un élément de la régulation de l'activité et du trafic des ATPases à cuivre humaines. Ainsi Vanderwerf et coll. ont montré qu'ATP7B est phosphorylée dans différents types cellulaires, notamment hépatocytaires, et qu'elle est hyper-phosphorylée dans ces cellules en présence d'une forte concentration de cuivre (Vanderwerf et coll. 2001). De plus le niveau de phosphorylation est corrélé à la localisation d'ATP7B, qui n'est hyper-phosphorylée que dans les vésicules adjacentes à la membrane plasmique et pas dans le TGN. Dans leurs études, les auteurs ont pu décrire deux régions cibles de la phosphorylation. La première, dans la région centrale de la protéine, est la cible d'une phosphorylation dite basale et indépendante du niveau de cuivre dans la cellule, alors que la seconde, située dans le domaine N-terminal, dépend du cuivre. La séquence de 63 acides aminés décrite par Guo et coll. (2005) contient des sites de phosphorylation potentiels et pourrait donc être un domaine cible de kinases sensibles au cuivre qui réguleraient l'activité et la localisation d'ATP7B. Si la phosphorylation d'ATP7A et d'ATP7B est bien établie (Vanderwerf et coll. 2001; Cobbold et coll. 2002; Voskoboinik et coll. 2003a), les kinases responsables de cette phosphorylation restent à déterminer, notamment les kinases sensibles au cuivre.

5.4. La machinerie protéique impliquée dans le trafic des ATPases à cuivre humaines.

Les Bedlingtons terriers forment une race de chiens fréquemment atteints d'une forme de toxicose à cuivre et ont été longtemps considérés comme un modèle animal de la maladie de Wilson. Cependant le gène *ATP7B* n'est pas à l'origine de cette maladie. La toxicose à cuivre canine est due à des mutations dans le gène *COMMD1* (van De Sluis et coll. 2002). Il a été montré que la protéine COMMD1 interagit avec le domaine N-terminal d'ATP7B, mais pas avec celui d'ATP7A, et ce serait des défauts dans ces interactions qui seraient en partie responsables de la maladie canine (Tao et coll. 2003). COMMD1 est la première protéine découverte d'une nouvelle famille de protéines n'existant que chez les vertébrés et dont les fonctions cellulaires sont variées (Maine et Burstein 2007). Le rôle exact de COMMD1 dans la régulation d'ATP7B n'est aujourd'hui pas clairement défini, mais il pourrait être lié à son interaction avec la protéine XIAP récemment découverte pour son rôle dans le métabolisme du cuivre et les voies de régulation du facteur nucléaire NF- κ B (Burstein et coll. 2004; Mufti et coll. 2006).

Récemment, un criblage par la technique du double hybride des interactions entre les régions cytoplasmiques d'ATP7A ou d'ATP7B et une banque d'ADNc a permis de mettre en évidence de nouvelles protéines susceptibles d'interagir avec les deux ATPases. Ainsi des interactions entre le domaine N-terminal d'ATP7B avec la sous-unité p62 de la dynactine et avec la glutaredoxin 1 (Lim et coll. 2006a et 2006b). La sous-unité p62 interagit avec ATP7B *via* une séquence comprise entre MBD4 et MBD6, cette interaction nécessite du cuivre et la présence du motif CxxC. La dynactine est un complexe protéique qui se lie aux microtubules, à la dynéine et aux protéines transportées *via* les microtubules. La dépendance au cuivre de cette interaction indique que ce complexe est probablement à l'origine du déplacement d'ATP7B vers la membrane apicale des hépatocytes. L'interaction avec la glutaredoxin 1 (GRX1) dépend également de la présence de cuivre et du motif CxxC. La GRX1 est connue pour son rôle dans la détoxication des ponts disulfures et la protection des thiols des cystéines par la conjugaison réversible des thiols avec le GSH. Ce mécanisme pourrait servir à la fois de protection et de régulation de la liaison du cuivre sur les MBD. GRX1 est aussi capable d'interagir avec ATP7A.

Un autre criblage par double hybride a permis de mettre en évidence des protéines interagissant avec le domaine C-terminal des ATPases de Wilson et de Menkes. ATP7B peut

interagir avec la protéine PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), un répresseur transcriptionnel des gènes Hox, famille de gènes impliqués dans le développement cellulaire (Ko et coll. 2006). Les deux protéines sont localisées dans le TGN et il a été proposé que cette interaction régulerait des signaux de la voie des kinases ERK. Mais les détails de cette interaction et du mécanisme qu'il sous-tend restent inconnus à ce jour. ATP7A interagit avec la protéine AIPP1 (ATPase-Interacting PDZ Protein), une petite protéine dont la fonction est inconnue et qui interagit avec un domaine PDZ potentiel de l'ATPase (Stephenson et coll. 2005). Les domaines PDZ sont des domaines d'interaction protéine-protéine intervenant dans le ciblage des protéines vers leur localisation subcellulaire. Cette interaction pourrait donc jouer un rôle dans le ciblage d'ATP7A vers la membrane basolatérale des cellules polarisées.

Objectifs

Ce travail de thèse a reposé sur deux axes majeurs. Le premier concerne une étude de la localisation et de la fonction cellulaire de Ccc2. Le second est une étude biochimique du mécanisme catalytique de l'ATPase.

Le premier axe se base sur l'étude de la localisation de Ccc2 par Yuan et coll. en 1997. Les auteurs rapportent que Ccc2 est localisée dans les vésicules de la voie sécrétoire. Ce résultat est cohérent avec la fonction connue de Ccc2 qui délivre le cuivre aux enzymes de cette voie. Cependant les auteurs n'identifient pas précisément le compartiment de résidence de l'ATPase. De plus, aucune étude de cette protéine clef de l'homéostasie du cuivre n'a été publiée sur son éventuel rôle en présence de concentrations toxiques de cuivre. Pourtant les ATPases humaines sont connues pour leur double rôle (i) délivrer le cuivre aux enzymes de la voie sécrétoire et (ii) détoxiquer la cellule en expulsant le cuivre hors du cytosol. La levure *Candida albicans* possède deux ATPases à cuivre homologues de Ccc2 : CaCcc2 et CaCrp1 (Weissman et coll. 2000 ; Weissman et coll. 2002). CaCcc2 remplit la même fonction que Ccc2. CaCrp1 est exprimée à la membrane plasmique de la levure et sert de pompe d'efflux en cas de surcharge en cuivre. CaCrp1 est la première ligne de défense contre le cuivre chez *C. albicans*, les métallothionéines n'intervenant qu'en deuxième ligne. Or chez *S. cerevisiae* ce sont les métallothionéines qui constituent cette première ligne, et à ce jour aucun mécanisme d'efflux ou de stockage du cuivre dans un compartiment intracellulaire n'a été mis en évidence dans les mécanismes de résistance au cuivre (Catty et coll. 1997 ; Diffels et coll. 2006). Pourtant, la vacuole de *S. cerevisiae* est connue pour son rôle dans les mécanismes de détoxification. Dans la première partie de ma thèse, je me suis donc interrogé sur le rôle éventuel de Ccc2 dans le stockage intracellulaire et la détoxification du cuivre. Dans un premier temps, je me suis attaché à préciser la localisation de Ccc2, puis j'ai étudié les implications de cette localisation dans le rôle cellulaire de Ccc2.

L'une des particularités de la prise en charge du cuivre dans les cellules est qu'il n'est jamais libre dans le cytoplasme. Le transfert d'une protéine à une autre implique toujours des interactions protéines-protéines. Dans ce cadre, l'acquisition du cuivre par les ATPases à cuivre via leur métallochaperonne a été intensivement étudiée. Le cuivre de la

métallochaperonne est transmis au MBD par un jeu d'échange de liaisons entre cystéines des motifs CxxC. Puis pour déclencher le cycle de transport, le cuivre doit se fixer au site intra-membranaire de transport CPC. D'après les résultats de la thèse d'Isabelle Morin (2005), le cuivre des MBD serait lui-même transféré au site intra-membranaire. A partir de là, deux scénarios sont possibles. Le premier postule un transfert direct du cuivre des MBD au site intra-membranaire. Le second postule l'existence d'un site intermédiaire entre les MBD et le site intra-membranaire. Cette dernière hypothèse sera l'objet de la deuxième partie de mes résultats. Nous y explorerons le rôle potentiel du domaine nucléotidique de l'ATPase dans le transfert du cuivre au sein de Ccc2.

Résultats

1. De la localisation à la fonction

1.1. Etude de la localisation de l'ATPase eucaryote Ccc2

La levure est un bon modèle de cellule eucaryote et nombre de découvertes en biologie cellulaire sont le fait d'études chez la levure transposées chez les eucaryotes pluricellulaires. Ainsi la découverte des mutants Sec par Novick et Schekman à la fin des années 70 (Novick et Schekman 1979; Novick et coll. 1980) marque une étape importante en biologie cellulaire dans l'étude du trafic des vésicules intracellulaires.

La levure a été intensivement utilisée dans l'étude du fonctionnement des ATPases à cuivre *in vivo*. Les nombreux outils à disposition chez cet organisme ont notamment été utilisés pour mettre en évidence les rôles distincts des différents MBD des ATPases humaines et caractériser l'impact de mutations d'ATP7A et d'ATP7B trouvées chez des malades. A *contrario* la localisation et le trafic de ces ATPases ont été principalement étudiés dans de nombreuses lignées cellulaires de mammifère. Ces études ont permis de déterminer la localisation des ATPases humaines en condition basale, en présence d'un excès de cuivre dans le milieu et de mettre en évidence un certain nombre des motifs importants pour leur localisation et leur trafic (Introduction §5). Cependant des questions restent en suspens dans ces études. Il s'agit notamment d'identifier sans ambiguïtés le compartiment de résidence de ces ATPases dans un milieu riche en cuivre, ou encore d'identifier tous les motifs participant à la régulation du trafic de ces ATPases. De ce fait il est intéressant d'étudier la localisation et le trafic de Ccc2 dans *Saccharomyces cerevisiae* afin de l'utiliser comme un modèle de la régulation du trafic cellulaire de ces ATPases.

La localisation de Ccc2 a été étudiée par Yuan et coll. en 1997. Pour cela, les auteurs ont fusionné CCC2 en phase avec une étiquette HA, sous le contrôle de son propre promoteur, dans un plasmide centromérique. Par immunofluorescence, ils ont montré que Ccc2 était présente dans des structures vésiculaires. L'utilisation de souches mutantes affectées dans différentes étapes de la voie sécrétoire leur a permis de préciser la localisation de Ccc2 au niveau du réseau trans-golgien et dans les compartiments de la voie sécrétoire. Cette localisation est en accord avec le rôle connu de Ccc2 qui est de délivrer le cuivre aux enzymes de la voie sécrétoire (Yuan et coll. 1995). Les auteurs concluent leur étude sur la nécessité de

préciser la localisation de l'ATPase par des expériences de colocalisation. En effet, si les mutants des voies sécrétoires permettent de déterminer les compartiments et les voies de transit d'une protéine, ils ne renseignent pas précisément sur la localisation d'une protéine et peuvent même la fausser. Par exemple dans le cas d'une protéine qui cycle constitutivement entre deux compartiments, un mutant de l'étape de transfert entre les deux compartiments entraîne une accumulation de la protéine dans le premier compartiment.

Nous avons donc décidé de poursuivre l'étude précédente en utilisant une protéine fusionnée avec une étiquette GFP (Green Fluorescent Protein) en C-terminal. En effet la technique d'immunofluorescence nécessite de fixer et de perméabiliser les cellules pour permettre à l'anticorps de pénétrer dans la cellule. La durée de préparation des cellules et le caractère drastique des traitements nécessaires peuvent entraîner des artefacts dans la localisation de la protéine. L'étiquette GFP permet d'étudier la localisation d'une protéine dans des cellules vivantes et dans leur milieu de culture. De plus la simplicité et la rapidité de préparation des échantillons limitent les risques d'artefact.

Dans ce chapitre nous étudierons la localisation et le trafic de Ccc2 et chercherons à identifier les motifs de Ccc2 déterminant sa localisation.

1.1.1. Localisation de Ccc2 par microscopie de fluorescence

1.1.1.1. Etude de la localisation en condition basale

En 2003, Huh et coll. ont réalisé une banque de souche de levure avec une étiquette GFP fusionnée en C terminal des ORF, au locus chromosomique (Huh et coll. 2003). Sur les 6234 ORF annotées du génome de levure, la localisation de 4156 protéines a pu être étudiée. Dans le cas de Ccc2, la faible expression endogène de la protéine n'a pas permis une localisation plus précise de Ccc2 que celle observée par Yuan et coll. en 1997. Nous avons donc décidé de fusionner Ccc2 à la GFP sous le contrôle du promoteur de PMA1 dans un plasmide centromérique. Nommé pCen-Ccc2-GFP, ce plasmide été utilisé pour toutes nos expériences de localisation. Il possède le gène *LEU2* qui permet de rétablir l'auxotrophie de la souche de levure pour la leucine. Dans nos expériences, les levures sont donc cultivées dans un milieu synthétique complet sans leucine noté SC-L (Synthétique Complet sans Leucine). La fonctionnalité de Ccc2 fusionnée à la GFP a été vérifiée à l'aide du test phénotypique utilisé pour étudier la fonctionnalité des ATPases à cuivre dans la levure (Introduction 2.2.4).

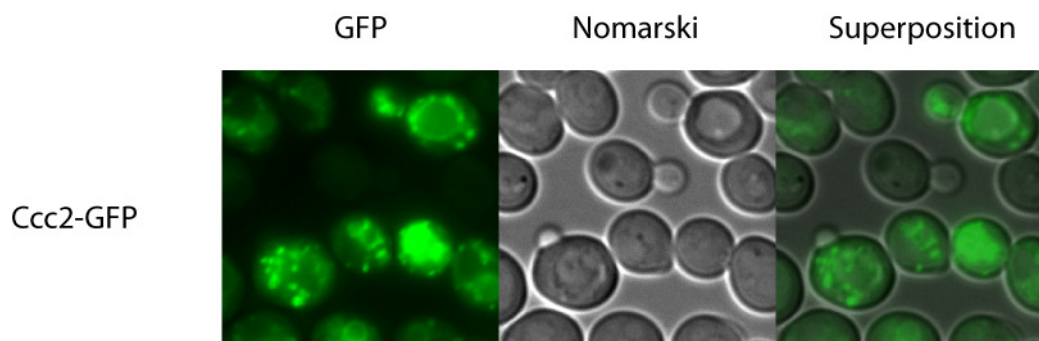


Figure R.1.1 : Localisation de Ccc2 par microscopie à fluorescence
(souche BY4741 transformée avec pCen-Ccc2-GFP)

Dans ce contexte Ccc2-GFP est présente sous forme ponctuée dans le cytoplasme (figure R.1.1). Ce signal ponctiforme pourrait correspondre à l'appareil de Golgi ou à des structures endosomales, comme décrit par Yuan et coll. en 1997. Cependant, de façon surprenante, le marquage de Ccc2 se confond parfaitement avec la membrane de la vacuole, telle qu'elle est délimitée sur la photo en Nomarski. Ainsi Ccc2 serait également adressée à la membrane de la vacuole.

1.1.1.2. Colocalisation de Ccc2

La localisation de Ccc2 par microscopie présente un motif ponctué caractéristique de protéines vésiculaires. Chez la levure différents compartiments peuvent présenter un tel motif, l'appareil de Golgi, le réseau trans-golgien ou encore les endosomes. Afin de préciser la localisation de Ccc2, nous avons décidé d'utiliser des protéines spécifiques de différents compartiments de la levure comme marqueur de ces derniers (Huh et coll. 2003). Ces protéines sont fusionnées à la RFP (Red Fluorescent Protein) et présentent une fluorescence dans le rouge. Ainsi, si Ccc2 est présente dans le même compartiment que la protéine de référence, un marquage jaune issu de la superposition des fluorescences de la GFP et de la RFP sera observé.

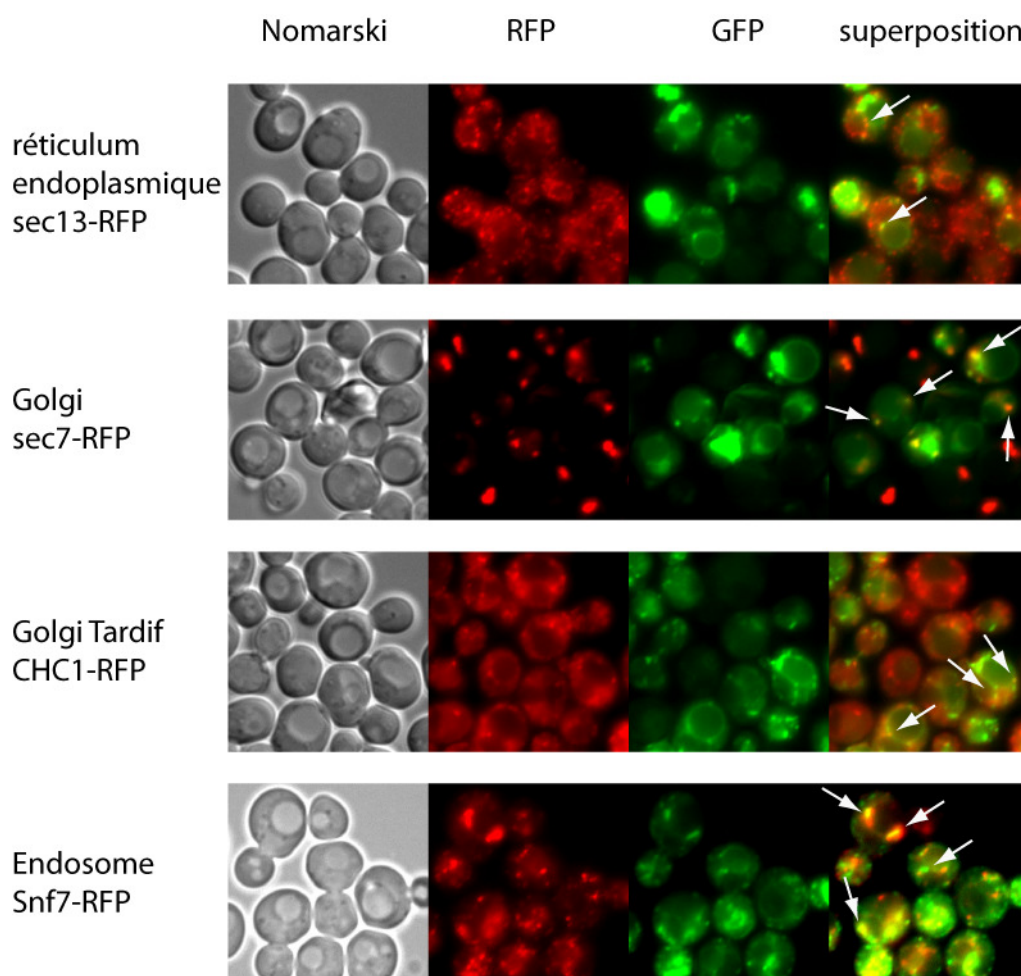


Figure R.1.2 : Localisation de Ccc2-GFP en présence des protéines de référence

Le marquage jaune signifiant la présence de Ccc2 et du marqueur dans la même vésicule est mis en évidence par une flèche blanche pour faciliter la lecture. (Souches BY4741-Sec13-RFP, BY4741-Sec7-RFP, BY4741-Chc1-RFP et BY4741-Snf7-RFP transformées avec pCen-Ccc2-GFP)

Comme nous pouvons l'observer (figure R.1.2), Ccc2 réside partiellement dans le compartiment de snf7, protéine résidente des endosomes tardifs. Mais Ccc2 se trouve également avec les marqueurs du réticulum endoplasmique (Sec13, protéine qui cycle entre le réticulum endoplasmique et le Golgi), de l'appareil de Golgi (Sec7, protéine qui cycle entre les faces cis et trans de l'appareil de Golgi), ou encore du Golgi tardif (Chc1, clathrine impliquée dans le transport des vésicules du Golgi tardif). Ainsi Ccc2 semble être présente dans l'ensemble des compartiments de la voie sécrétoire. Cette localisation peut s'expliquer de deux manières différentes. La première explication considère que les endosomes et la membrane vacuolaire sont les compartiments finaux de Ccc2, et que les colocalisations observées avec le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le Golgi tardif ne reflètent que le passage de la protéine dans ces compartiments pour atteindre sa destination finale. La seconde explication considère le rôle de Ccc2 déjà connu, qui est de donner du cuivre aux

enzymes nouvellement synthétisées telles que Fet3 qui transitent par la voie sécrétoire avant d'atteindre la membrane plasmique. Il n'est donc pas étonnant de retrouver Ccc2 tout le long de la voie sécrétoire puisqu'elle accompagnerait les enzymes néo-synthétisées.

Une expérience utilisant la cycloheximide, qui bloque la synthèse protéique de la cellule, permettrait de déterminer si Ccc2 réside de manière permanente dans les endosomes et à la membrane vacuolaire ou si la protéine cycle entre le Golgi et la membrane de la vacuole.

Il est intéressant de noter que les agrégats de Ccc2 observés dans certaines levures ne correspondent pas à une prolifération de réticulum endoplasmique comme cela est observé lorsque la surexpression d'une protéine provoque une accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (Degand et coll. 1999). Dans nos expériences, les levures ne montrent pas de défaut de morphologie du réticulum endoplasmique.

De ces expériences de colocalisation, nous pouvons conclure que Ccc2 est majoritairement localisée à la membrane des endosomes et à la membrane de la vacuole. Nous avons ainsi précisé le compartiment post golgien évoqué dans la publication de Yuan et coll. (1997).

Cependant la localisation à la membrane vacuolaire n'avait jamais été observée auparavant et pourrait être due à un artefact de nos conditions de microscopie. Pour nous assurer que nos observations ne sont pas un artefact dû à l'étiquette GFP ou à la surproduction induite par le plasmide, nous avons vérifié par centrifugation sur gradient de sucrose, la localisation de Ccc2 endogène étiquetée au locus chromosomique.

1.1.2. Etude de la localisation de Ccc2 endogène.

1.1.2.1. Localisation de Ccc2 par gradient linéaire de sucrose

Pour étudier la localisation de Ccc2 par centrifugation sur gradient linéaire de sucrose, nous avons marqué Ccc2 avec une petite étiquette hémagglutinine (HA, séquence: YPYDVPDYA) en C-terminal, au locus chromosomique. Une souche BY4741-Ccc2-HA a donc été construite (Matériels et Méthodes §3.3.2).

A partir de cette souche, nous avons effectué une lyse en condition douce (sans détergent), puis nous avons séparé les différents organites sur un gradient de sucrose linéaire (20 – 60 %). Après centrifugation, 15 fractions distinctes ont été récupérées. Les protéines présentes dans chaque fraction ont été précipitées à l'acide, séparées sur gel d'acrylamide,

puis transférées sur membrane de nitrocellulose pour l'immunodétection. Un anticorps contre l'étiquette HA a été utilisé pour détecter Ccc2. Les fractions contenant les membranes du Golgi tardif et celles des endosomes ont été révélées avec un anticorps dirigé contre Vps10, le récepteur membranaire de la protéase vacuolaire CPY (CarboxyPeptidase Y) (Vps10 cycle entre l'appareil de Golgi et les endosomes tardifs), les endosomes avec un anticorps dirigé contre la SNARE Pep12 (protéine qui cycle entre vésicules pré-endosomales et endosomes tardifs), les membranes de la vacuole avec un anticorps dirigé contre une sous-unité membranaire de Vma1, l'ATPase à protons vacuolaire, et la membrane plasmique avec un anticorps dirigé contre Pma1, l'ATPase à protons de la membrane plasmique (figure R.1.3).

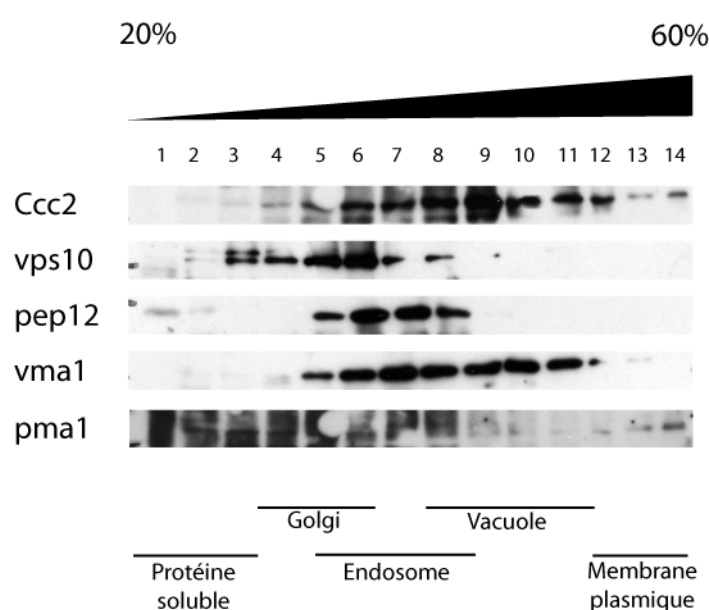


Figure R.1.3 : Localisation de Ccc2 par sédimentation différentielle sur gradient linéaire de sucrose dans la souche BY4741-Ccc2-HA.

Ccc2 est révélée par son étiquette HA, la disposition des différents organites est révélée par des anticorps spécifiques des marqueurs : Vps10 pour Golgi tardif/endosomes, Pep12 pour les endosomes, Vma1 pour la vacuole et Pma1 pour la membrane plasmique. Figure représentative de trois expériences indépendantes.

Dans ce gradient, Ccc2 est principalement localisée dans les fractions 6 à 12 qui correspondent aux fractions où se répartissent les marqueurs des membranes du Golgi, des endosomes et de la vacuole. De ce fait, comme attendu, Ccc2 est retrouvée dans les compartiments post-golgiens de la voie sécrétoire. Une faible fraction de Ccc2 est aussi trouvée dans les fractions 13 et 14, correspondant au marqueur de la membrane plasmique Pma1. Il est donc possible qu'une fraction de Ccc2 puisse accompagner Fet3 jusqu'à la membrane plasmique pendant sa maturation. Le profil de répartition de Ccc2 correspond de façon surprenante à celui de Vma1. Ce résultat semble indiquer que Ccc2 est bien localisée de

manière constitutive à la membrane de la vacuole comme l'est Vma1 et que le résultat de microscopie n'est dû ni à la surexpression de Ccc2, ni à l'étiquette GFP. La localisation de la protéine endogène valide donc notre stratégie d'étude en microscopie de fluorescence avec un plasmide surexprimant Ccc2 étiquetée avec la GFP.

1.1.2.2. Préparation de vacuoles isolées

Afin de confirmer encore une fois ce résultat inattendu, nous avons recherché la présence de Ccc2 dans des préparations de vacuoles isolées. Pour ce faire nous avons utilisé la technique décrite par Sarry et coll. en 2007 lors de leur analyse du protéome de la lumière de la vacuole. Cette technique d'extraction douce des vacuoles permet d'obtenir des vacuoles entières très pures (Matériels et Méthodes §4.5)

Nous avons donc effectué une extraction de vacuole à partir de la souche BY4741-Ccc2-GFP construite par Huh et coll. (2003). Les protéines marqueurs des différents compartiments ont été utilisées pour caractériser l'enrichissement en fraction vacuolaire et la pureté de l'échantillon. Nous avons comparé l'enrichissement à un extrait brut de cellules. Les quantités de protéine variant entre l'extrait brut et la préparation de vacuoles pures, les temps d'exposition entre les différentes pistes ne sont pas les mêmes (figure R.1.4).

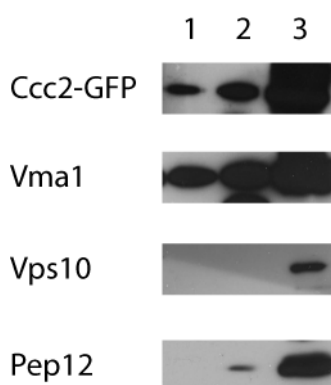


Figure R.1.4 : Analyse de la pureté de la préparation de vacuole purifiée

(souche BY4741-Ccc2-GFP)

Ccc2 est révélée par son étiquette GFP, la présence d'organites contaminants est révélée par des anticorps spécifiques des marqueurs Vps10 pour Golgi tardif/endosomes, Pep12 pour endosomes et Vma1 pour la vacuole.

Pistes 1 : vacuoles purifiées, 2 : vacuoles après le premier gradient, 3 : extrait brut de levure

Malgré une exposition de plus d'une demi-heure, il a été impossible de détecter la présence des marqueurs Pep12 ou Vps10 dans la préparation, alors qu'ils étaient rapidement détectables dans l'extrait brut. Seul Vma1 a pu être détectée dans la fraction vacuolaire. De ce fait les vacuoles peuvent être considérées comme pure. Nous avons pu détecter Ccc2 dans ces

fractions vacuolaires confirmant ainsi une localisation de Ccc2 endogène dans des conditions standards de culture à la membrane de la vacuole.

L'ensemble de ces résultats indique très clairement que Ccc2 n'est pas localisée que dans les membranes des compartiments de la voie sécrétoire, mais aussi dans la membrane de la vacuole. Ce dernier résultat n'avait jamais été décrit.

1.1.3. Effet des conditions de culture sur la localisation de Ccc2

1.1.3.1. Effet du cuivre sur la localisation de Ccc2

La régulation de Ccc2 en fonction des conditions en cuivre du milieu a été peu étudiée. Une étude de transcriptomique très récente montre que la transcription de Ccc2 est augmentée d'un facteur 2 lorsque les concentrations en cuivre dépassent les 5 mM dans un milieu YPD (Jin et coll. 2008). Par ailleurs, la localisation des homologues humains de Ccc2 que sont ATP7A et ATP7B est connue pour dépendre de la concentration extracellulaire en cuivre, contrairement à leur expression qui semble y être insensible (Petrus et coll. 1996; Roelofsen et coll. 2000). Il est donc possible que la localisation de Ccc2 varie en fonction de la concentration en cuivre. Pour aborder cette question, nous avons étudié la localisation de Ccc2 dans des levures exposées 2h dans un milieu contenant des concentrations croissantes de cuivre (figure R.1.5).

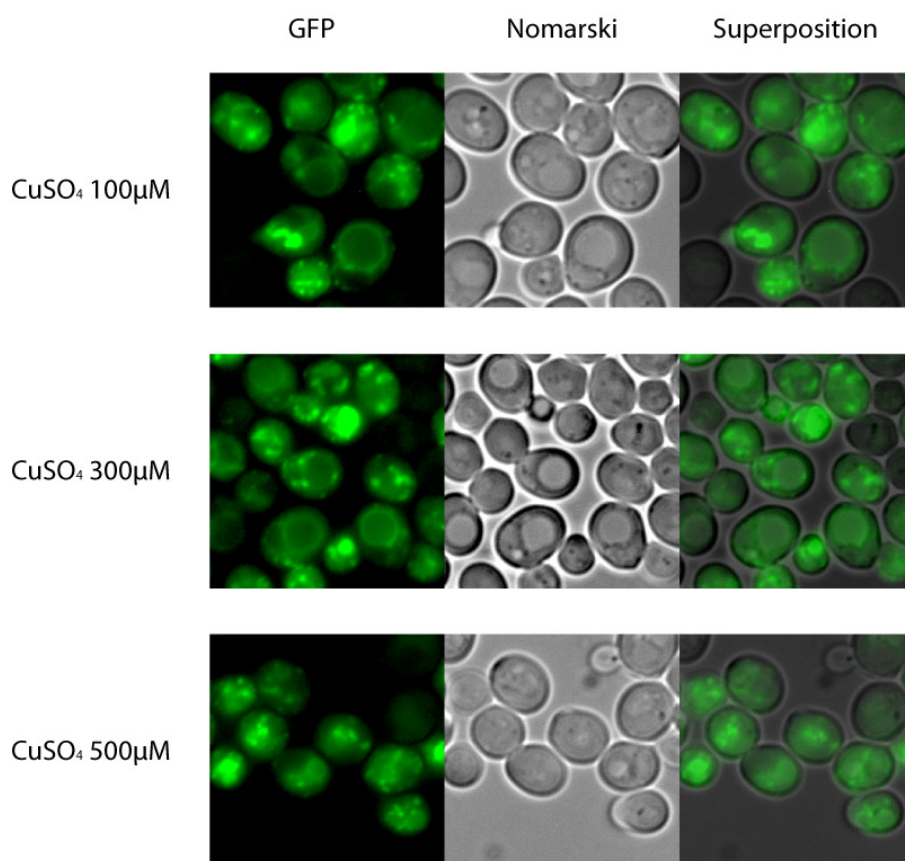


Figure R.1.5 : Localisation de Ccc2 en présence de concentrations croissantes de cuivre
(souche BY4741 transformée avec pCen-Ccc2-GFP ; exposition de 2h au cuivre aux concentrations indiquées)

En présence d'un excès de cuivre nous observons une disparition progressive du marquage à la membrane de la vacuole. Le signal devient majoritairement ponctué à partir de 500 μM de CuSO_4 dans le milieu. Ainsi Ccc2 est localisée dans des vésicules cytoplasmiques quand le milieu devient excédentaire en cuivre. Ce résultat peut être dû à un arrêt de l'adressage à la vacuole suivi d'une dégradation de Ccc2 à la membrane de la vacuole ou bien à une migration de Ccc2 de la membrane vacuolaire vers des vésicules. Cependant les phénomènes de migration des protéines sont généralement rapides. Ainsi dans le cas de l'ATPase de Menkes exprimée dans des cellules CHO résistantes au cuivre, le changement de localisation est accompli dans les 15 min qui suivent l'ajout du cuivre dans le milieu (Pase et coll. 2004). Ici la disparition du marquage à la vacuole n'est complet qu'après 2h de traitement, une durée qui équivaut au temps de génération de la souche dans ces conditions de croissance.

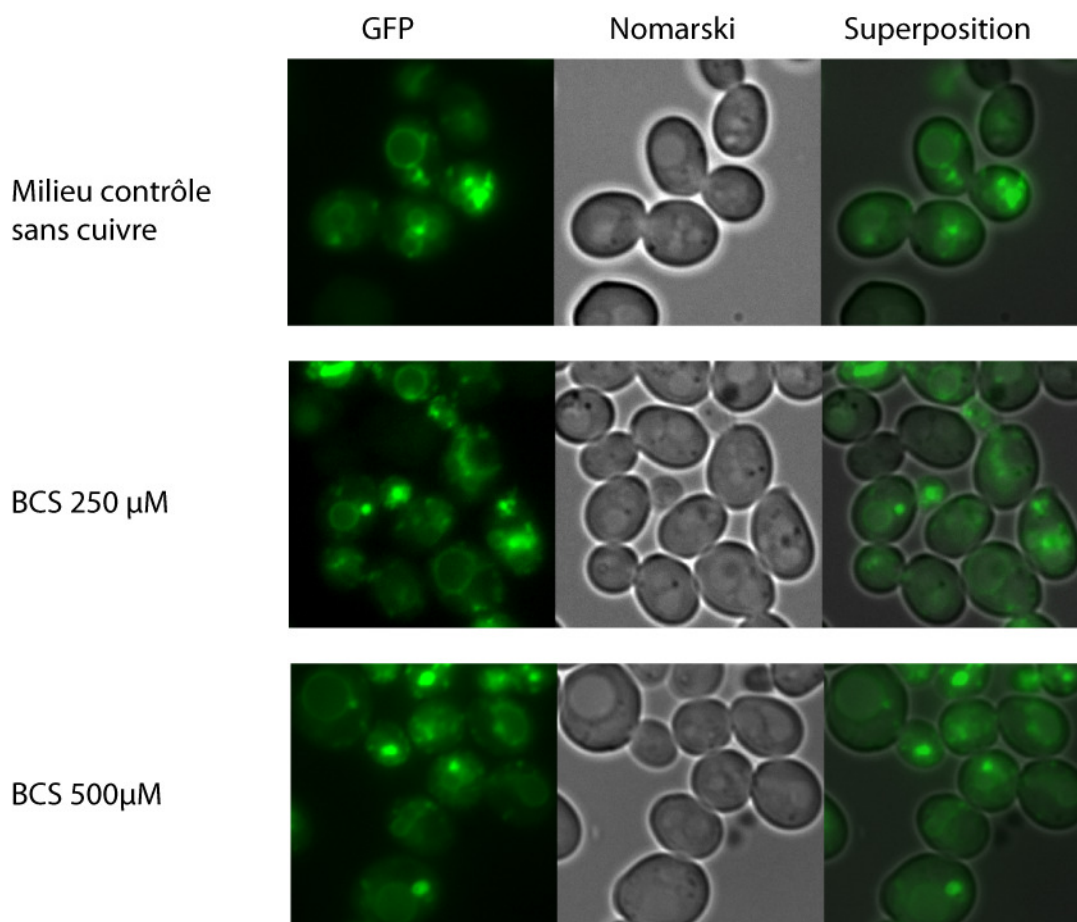


Figure R.1.6 : Localisation de Ccc2 en absence de cuivre.

(souche BY4741 transformée par pCen-Ccc2-GFP ; exposition de 2h à des concentrations croissantes de BCS dans un milieu de culture initialement sans cuivre)

La carence en cuivre ne semble pas avoir d'effet sur la localisation de Ccc2 (figure R.1.6). Sa localisation partagée entre des vésicules et la membrane de la vacuole semble donc être sa localisation basale.

Le pH du milieu SC-L utilisé est inférieur à 4,5 et s'acidifie au cours de la croissance des levures. Au laboratoire, les études *in vivo* de la voie Atx1 – Ccc2 utilisent un milieu carencé en fer et en cuivre et tamponné à pH 6.1. Nous savons par ailleurs que la tolérance aux métaux de *S. cerevisiae* est d'autant plus faible que le pH du milieu est alcalin (Serrano et coll. 2002). Nous avons donc choisi de regarder si une telle stabilisation du pH influence la localisation de Ccc2 (figure R.1.7).

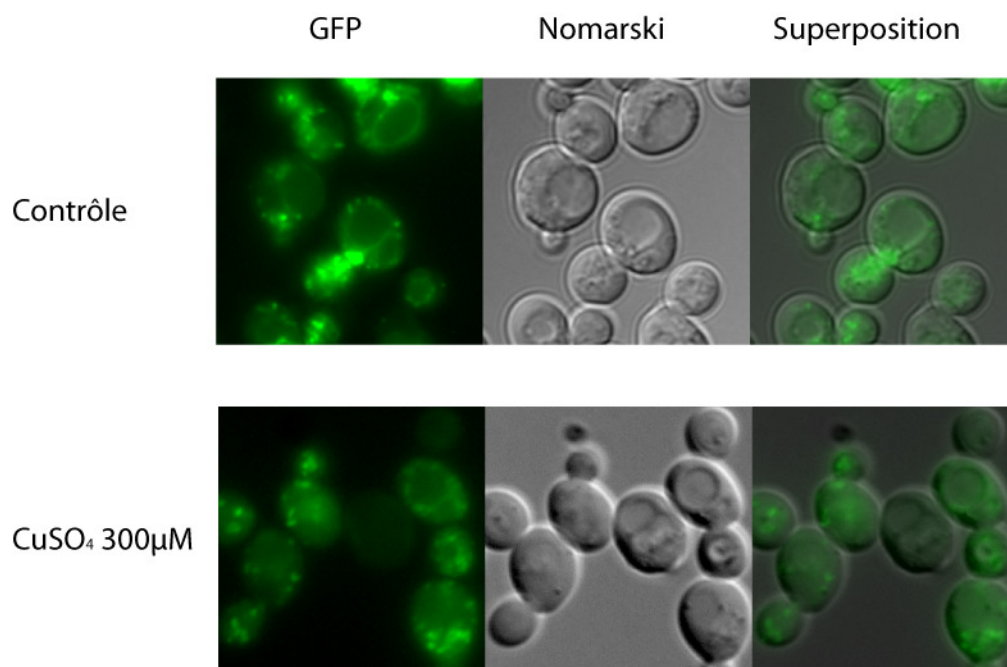


Figure R.1.7 : Localisation de Ccc2 en présence de cuivre dans un milieu SC-L tamponné à pH 6,1 (MES-NaOH) (souche BY4741 transformée par pCen-Ccc2-GFP ; exposition de 2h à 300 μ M de cuivre)

Si le maintien du pH à 6,1 n'influence pas la localisation de Ccc2 en condition standard, il stimule le déplacement de Ccc2 vers les vésicules à une concentration en cuivre plus faible que précédemment. En effet, il n'y a plus de marquage à la membrane de la vacuole après une exposition à 300 μ M de cuivre.

1.1.3.2. Effet du fer sur la localisation de Ccc2

Ccc2 se trouve à la croisée de l'homéostasie du fer et du cuivre, de ce fait nous avons regardé si le fer avait un effet sur la localisation de Ccc2. Dans ces expériences, nous avons choisi d'utiliser le milieu carencé en fer utilisé par Forbes et Cox pour leurs expériences de complémentation en milieu liquide de la voie Atx1 – Ccc2 par ATP7B (Forbes et Cox 1998). Cette expérience nous permet également de connaître la localisation de Ccc2 dans les conditions utilisées pour l'étude de la fonctionnalité des ATPases à cuivre humaines dans la levure.

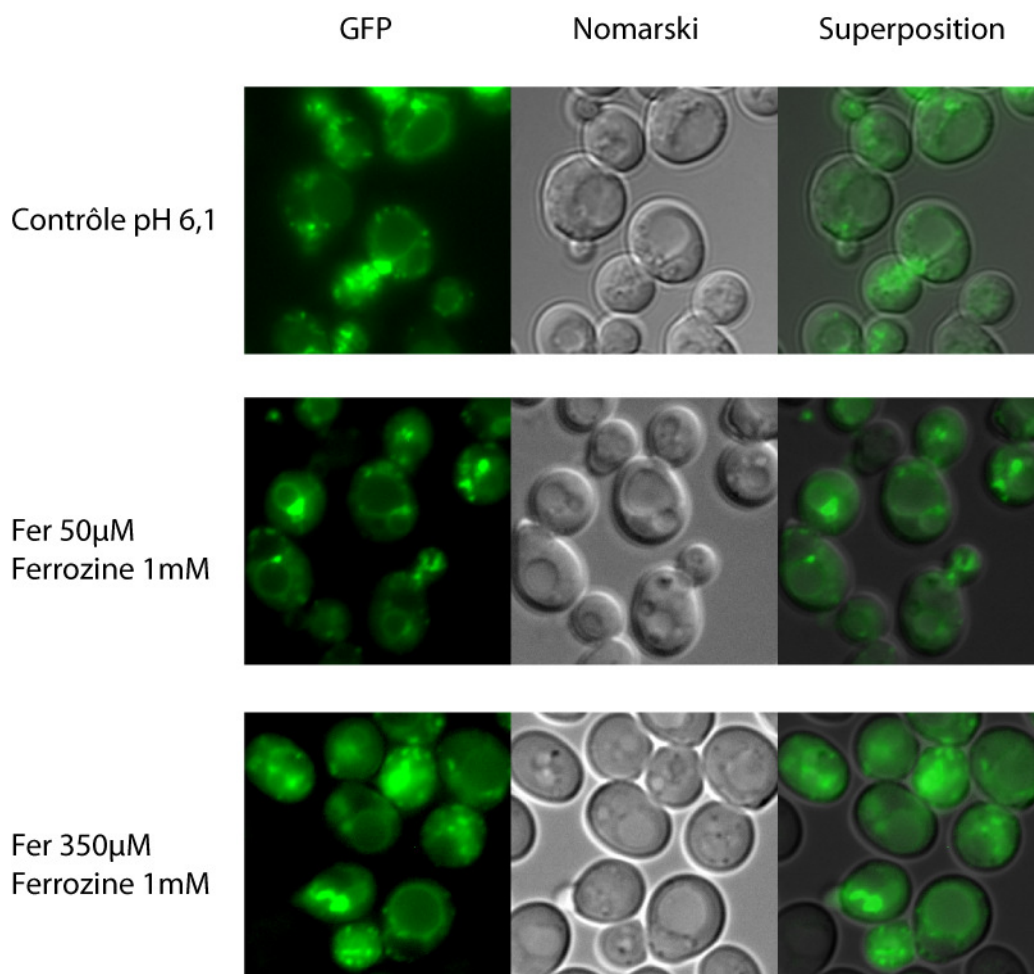


Figure R.1.8 : Localisation de Ccc2 dans un milieu SC-L tamponné à pH 6,1 (MES-NaOH) et carencé ou en excès de fer (souche BY4741 transformée avec pCen-Ccc2-GFP ; exposition de 10h au mélange fer/ferrozine)

Ainsi que nous pouvons le constater ces conditions de culture n'influent pas sur la localisation de Ccc2 (figure R.1.8).

En résumé, la carence en cuivre n'a pas d'effet sur la localisation de Ccc2. *A contrario*, Ccc2 se déplace vers un compartiment vésiculaire qui reste à identifier en présence d'un excès de cuivre dans le milieu de culture. Contrairement aux ATPases humaines, Ccc2 n'est pas constitutivement localisée dans le réseau trans-golgien, mais se partage entre un compartiment vésiculaire et la membrane de la vacuole. Mais comme les ATPases humaines, Ccc2 subit un changement de localisation en présence d'un excès de cuivre. Enfin, si la concentration de cuivre dans le milieu de culture influence la localisation de Ccc2 dans la levure, la concentration en fer semble sans effet.

1.1.4. Adressage de Ccc2 à la vacuole.

L'étude de l'adressage des protéines nouvellement synthétisées a permis de définir 3 grandes voies de trafic entre l'appareil de Golgi et la vacuole (figure R.1.9) :

- la voie endocyttaire, qui comme son nom l'indique, dépend de la formation d'endosomes précoces ;
- la voie CPY, empruntée par la carboxypeptidase Y

ces deux voies convergent vers les endosomes tardifs (MVB) pour rejoindre la vacuole ;

- la voie ALP, empruntée par la phosphatase alcaline qui atteint directement la vacuole

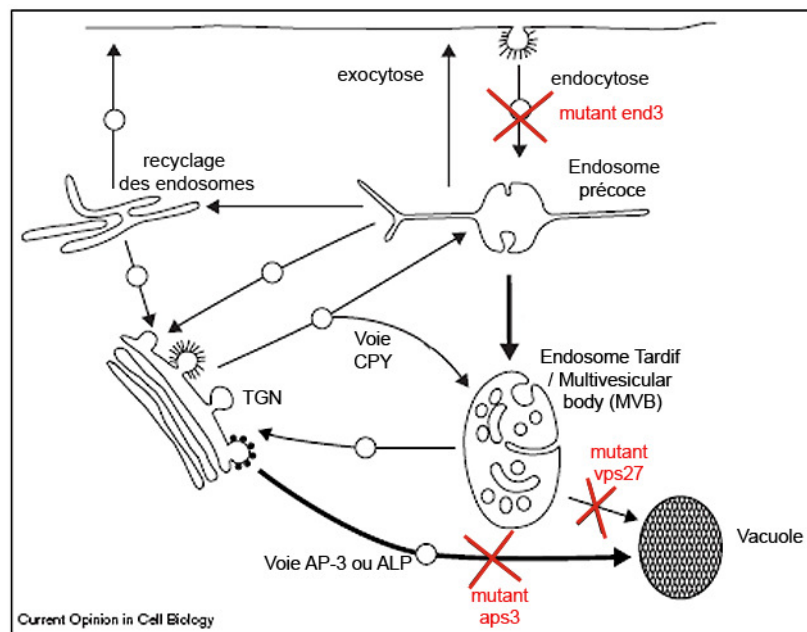


Figure R.1.9 : Représentation schématique des voies d'adressage des protéines à la vacuole
 (d'après (Lemmon et Traub 2000))

Des mutants de la souche BY4741 sont disponibles dans lesquels l'une ou l'autre de ces voies d'adressage sont bloquées (Bowers et Stevens 2005). La voie endocyttaire est bloquée par une délétion du gène *end3* codant pour une protéine indispensable à la formation des vésicules d'endocytose. La voie CPY est bloquée par la délétion du gène *vps27* codant pour une protéine du complexe ESCRT-0 indispensable à la sortie des vésicules des MVB. Et la voie ALP est bloquée par la délétion du gène *aps3* codant pour une protéine du complexe AP-3, indispensable pour la sortie de l'appareil de Golgi des protéines empruntant cette voie.

Ainsi si Ccc2 est adressée à la vacuole via l'une ou l'autre de ces voies, alors nous devrions observer une disparition du marquage à la membrane vacuolaire.

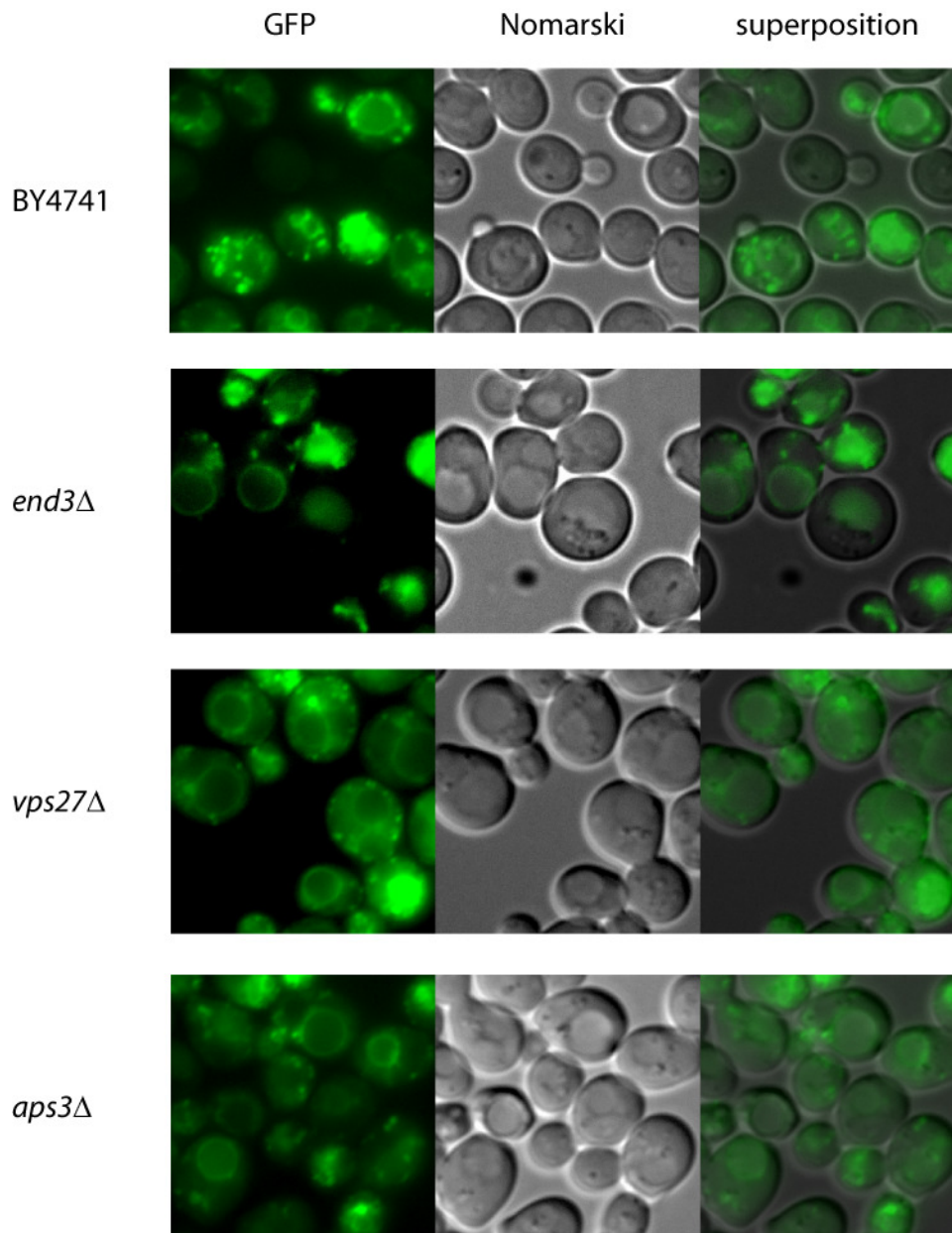


Figure R.1.10 : Localisation de Ccc2 dans des mutants des voies d'adressage à la vacuole
(souches BY4741 sauvage et mutantes transformées avec pCen-Ccc2-GFP)

Nous pouvons constater sur la figure R.1.10 qu'aucun de ces mutants n'est en mesure de bloquer l'adressage de Ccc2 à la membrane de la vacuole.

La littérature nous apprend que ces voies d'adressage ne sont pas étanches. Par exemple dans une souche *vps10Δ*, dont un gène indispensable à la voie CPY est inactivée, seul 10 % de la CPY atteint la vacuole, mais 50 % de l'hydrolase vacuolaire protéinase A (pep4) est encore délivrée à la vacuole (Bowers et Stevens 2005). De ce fait si certaines

protéines sont exclusives de l'une ou l'autre de ces voies, d'autres sont capables d'emprunter plusieurs chemins pour atteindre la vacuole ou d'emprunter une voie alternative si leur voie d'adressage est bloquée. Ccc2 est probablement l'une d'entre elle.

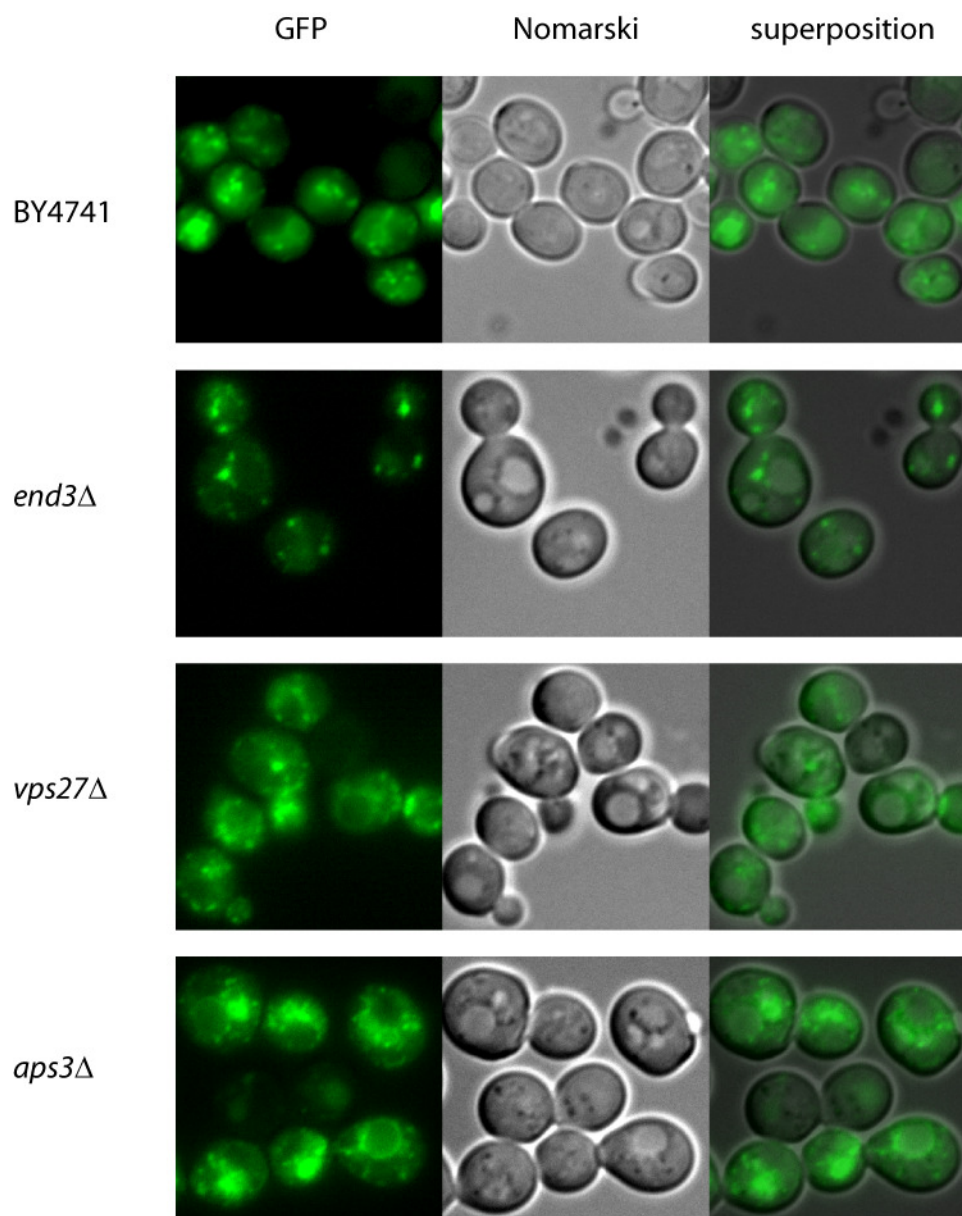


Figure R.1.11 : Localisation de Ccc2 dans des mutants des voies d'adressage à la vacuole après 2h d'exposition à 500 μ M de cuivre
(souches BY4741 sauvage et mutantes transformées avec pCen-Ccc2-GFP)

L'étude de la localisation de Ccc2 dans ces mutants d'adressage à la vacuole a été répétée en présence de 500 μ M de CuSO_4 dans le milieu de culture (figure R.1.11). Elle montre que l'interruption des voies endocytaires n'a pas d'effet sur le changement de localisation de Ccc2 qu'induit le traitement au cuivre. Cependant, dans les souches *aps3Δ* et

vps274, nous n'observons qu'une disparition partielle du marquage à la membrane vacuolaire, dans des conditions induisant la disparition totale de ce marquage dans la souche contrôle. Si nous considérons que la disparition du marquage est due à un déplacement de l'ATPase vers des vésicules en condition d'excès de cuivre, alors nous pouvons affirmer que les voies ALP et CPY jouent un rôle dans ce mécanisme. Ce résultat est au contraire difficilement compatible avec l'hypothèse d'un blocage de l'adressage à la vacuole suivi de la dégradation de Ccc2 induits par la présence de 500 μ M de cuivre. En effet le blocage de la voie d'adressage aurait tendance à favoriser la disparition du marquage.

En résumé, en condition basale, Ccc2 n'emprunte pas exclusivement une voie pour atteindre la membrane de la vacuole, mais au moins les voies ALP et CPY. Ces voies semblent toutes les deux participer au déplacement de Ccc2 induit par l'excès de cuivre. Enfin ces expériences nous permettent d'exclure un rôle de la voie endocytaire dans la localisation de Ccc2 à la vacuole.

1.1.5. Etude des motifs influençant la localisation de Ccc2

Les ATPases de type P1 sont définies par une structure et des motifs strictement conservés entre les différentes protéines de la famille. Nous pouvons différencier les motifs communs à toutes les ATPases de type P que sont les motifs de phosphorylation DKTGT et de déphosphorylation TGE, des motifs spécifiques aux ATPases à métaux mous que sont les motifs CxxC des MBD et le motif de transport intramembranaire CPC. Comme nous l'avons vu dans l'introduction (§5.3), dans les ATPases à cuivre humaines, il existe un lien entre leur fonctionnalité, leur localisation et leur trafic. Dans ce paragraphe nous étudierons l'effet des mutations de ces motifs consensus sur la localisation de Ccc2.

1.1.5.1 Les motifs conservés des ATPases de type P

L'acide aspartique du motif D⁶²⁷KTGT est la cible de la phosphorylation autocatalytique de l'ATPase au cours du cycle enzymatique (figure R.1.12). Sa mutation en alanine inhibe irrémédiablement l'activité de l'ATPase.

D'après les données disponibles sur l'ATPase calcium Serca1a, le motif TGE catalyse l'hydrolyse du groupement phosphate du phosphorylenzyme et sa mutation inhibe fortement

la déphosphorylation de l'ATPase (Anthonisen et coll. 2006). Cette hydrolyse reste thermodynamiquement favorable, mais la vitesse de la réaction n'est pas compatible avec la cinétique de l'ATPase. Ainsi ce mutant est constitutivement phosphorylé *in vitro* et n'est pas fonctionnel *in vivo*. La mutation TGE-AAA peut être considérée comme l'opposé de la mutation D627A.

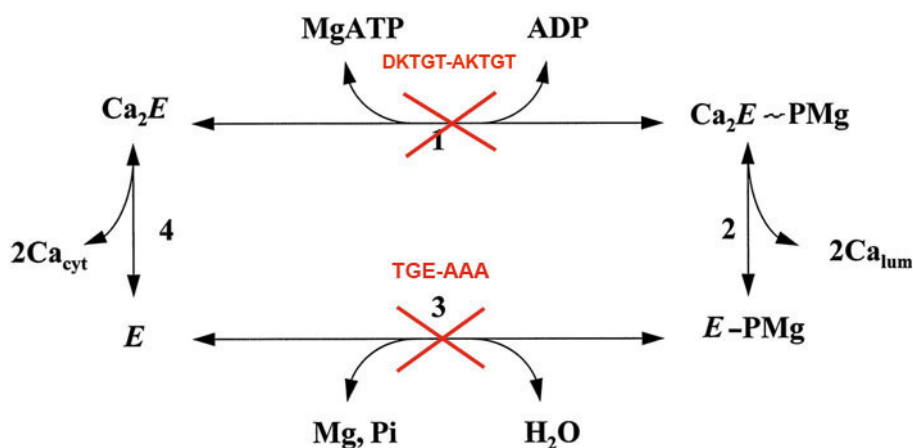


Figure R.1.12 : Cycle de l'ATPase à calcium (d'après Jencks 1989)

La localisation du mutant D627A est identique à celle de la protéine sauvage dans les conditions normales de culture. Ce résultat indique que la protéine n'a pas besoin d'être fonctionnelle pour être correctement localisée. Par contre, en présence de cuivre le mutant D627A reste à la membrane de la vacuole, contrairement à la protéine sauvage. Une protéine phosphorylable est donc indispensable à la réponse de Ccc2 au cuivre (figure R.1.13).

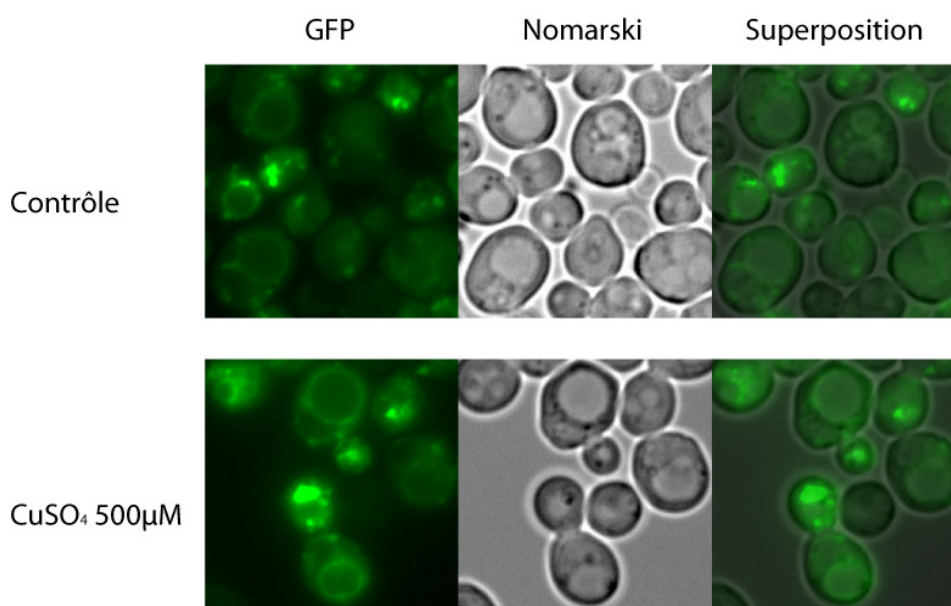


Figure R.1.13 : Localisation de Ccc2-D627A en condition basale et en présence de cuivre (souche BY4741-ccc2Δ transformée avec pCen-Ccc2-D627A-GFP ; exposition de 2h au cuivre)

Le mutant TGE-AAA présente une localisation majoritairement vésiculaire, semblable à celle de la protéine sauvage en présence d'un excès de cuivre dans le milieu de culture. Ce résultat confirme l'importance de la phosphorylation dans la réponse de Ccc2 au cuivre, et laisse penser que cette dernière pourrait être un signal pour le changement de localisation. Comme dans le cas de l'ATPase à calcium, la déphosphorylation de Ccc2 n'est vraisemblablement pas totalement inhibée par la mutation TGE-AAA. Ainsi nous pouvons penser qu'en cas de carence en cuivre importante, la concentration en cuivre intracellulaire serait suffisamment faible pour ne pas activer Ccc2-TGE-AAA. Dans ce cas, une localisation de Ccc2-TGE-AAA à la membrane de la vacuole pourrait être observée. Ce résultat a pu être obtenu après une culture de 12h de la souche exprimant Ccc2-TGE-AAA dans un milieu sans cuivre ajouté, suivie d'un traitement de 2h par 500 μ M de BCS (figure R.1.14).

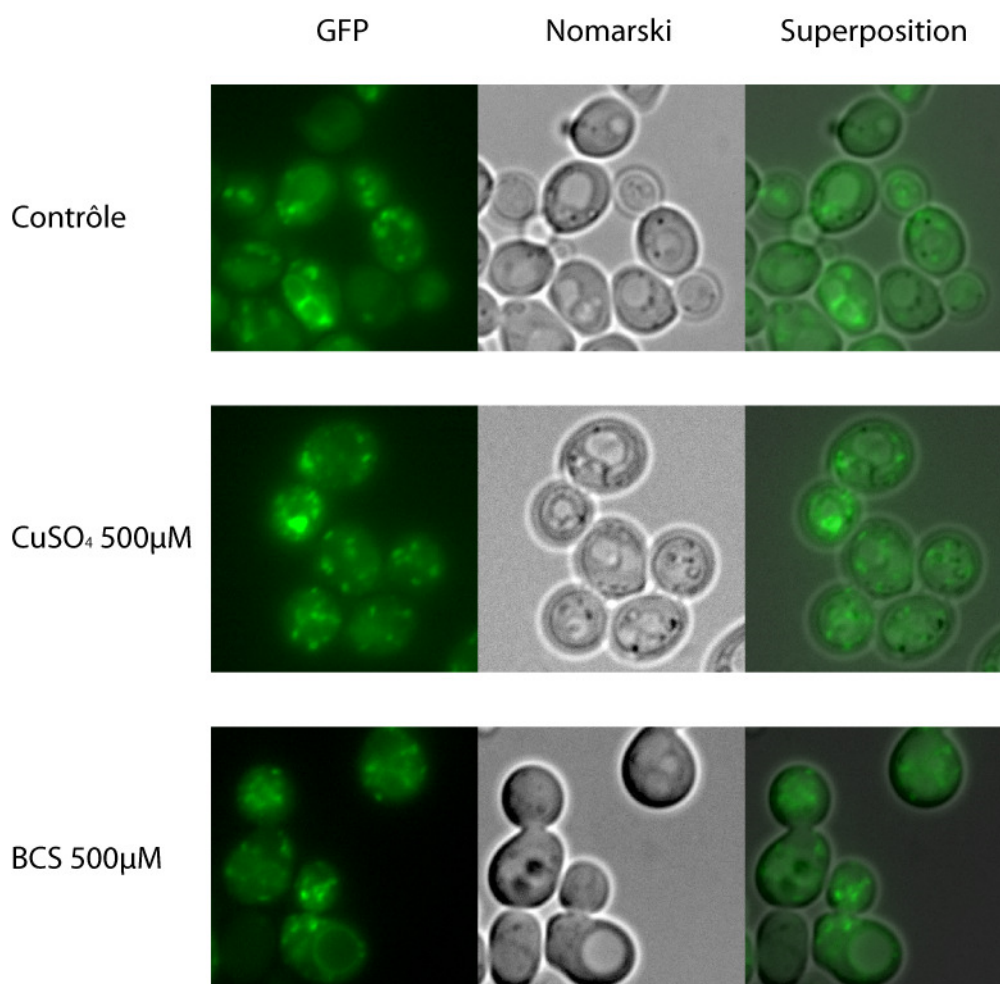


Figure R.1.14 : Localisation de Ccc2-TGE-AAA en condition basale, en présence ou en absence de cuivre (souche BY4741-*ccc2Δ* transformée avec pCen-Ccc2-TGE-AAA-GFP ; exposition de 2h au cuivre ou au BCS)

Ces résultats confirment les résultats obtenus sur les ATPases à cuivre humaines selon lesquels leur phosphorylation catalytique est un élément essentiel à leur trafic (Petrakis et coll. 2002). Ils nous confortent dans l'idée que Ccc2 est un bon modèle pour l'étude du trafic des ATPases à cuivre.

1.1.5.2. Les motifs spécifiques aux ATPases à cuivre.

Ainsi que nous venons de le voir, la localisation de Ccc2 est sensible à la présence de cuivre dans le milieu extérieur. Dans l'optique de déterminer les motifs responsables de cette sensibilité, nous avons décidé d'étudier l'effet de mutations affectant la capacité de Ccc2 à fixer le cuivre.

L'importance des MBD dans le trafic des ATPases est sujette à débat. D'après les données de Guo et coll. (2005), les MBD ne jouent aucun rôle dans le déplacement d'ATP7B en présence d'un excès de cuivre. En revanche, une séquence de 63 acides aminés dans le N-terminal d'ATP7B serait indispensable à cette réponse. Cette séquence est absente des séquences d'ATP7A et de Ccc2. Et il a été montré que l'inactivation ou la délétion des MBD d'ATP7A entraîne un défaut de réponse au cuivre de l'ATPase (Introduction 5.3.2). Cependant ces substitutions ou ces délétions dans le cas d'ATP7A et d'ATP7B ont un effet délétère sur la fonction de l'ATPase (Introduction 4.3). Dans le cas de Ccc2, il a été montré que sa fonction était altérée par la mutation en sérine des cystéines du motif CxxC des MBD (M1ssM2ssCcc2), mais que la délétion d'un des MBD et la mutation en sérine de l'autre MBD (M1ssCcc2) ou que la délétion des deux MBD (Δ MBDCcc2) n'altéraient pas le fonctionnement de l'ATPase (Morin 2005). Nous disposons donc d'un modèle de choix pour étudier le rôle des MBD dans la réponse au cuivre des ATPases à cuivre (figure R.1.15).

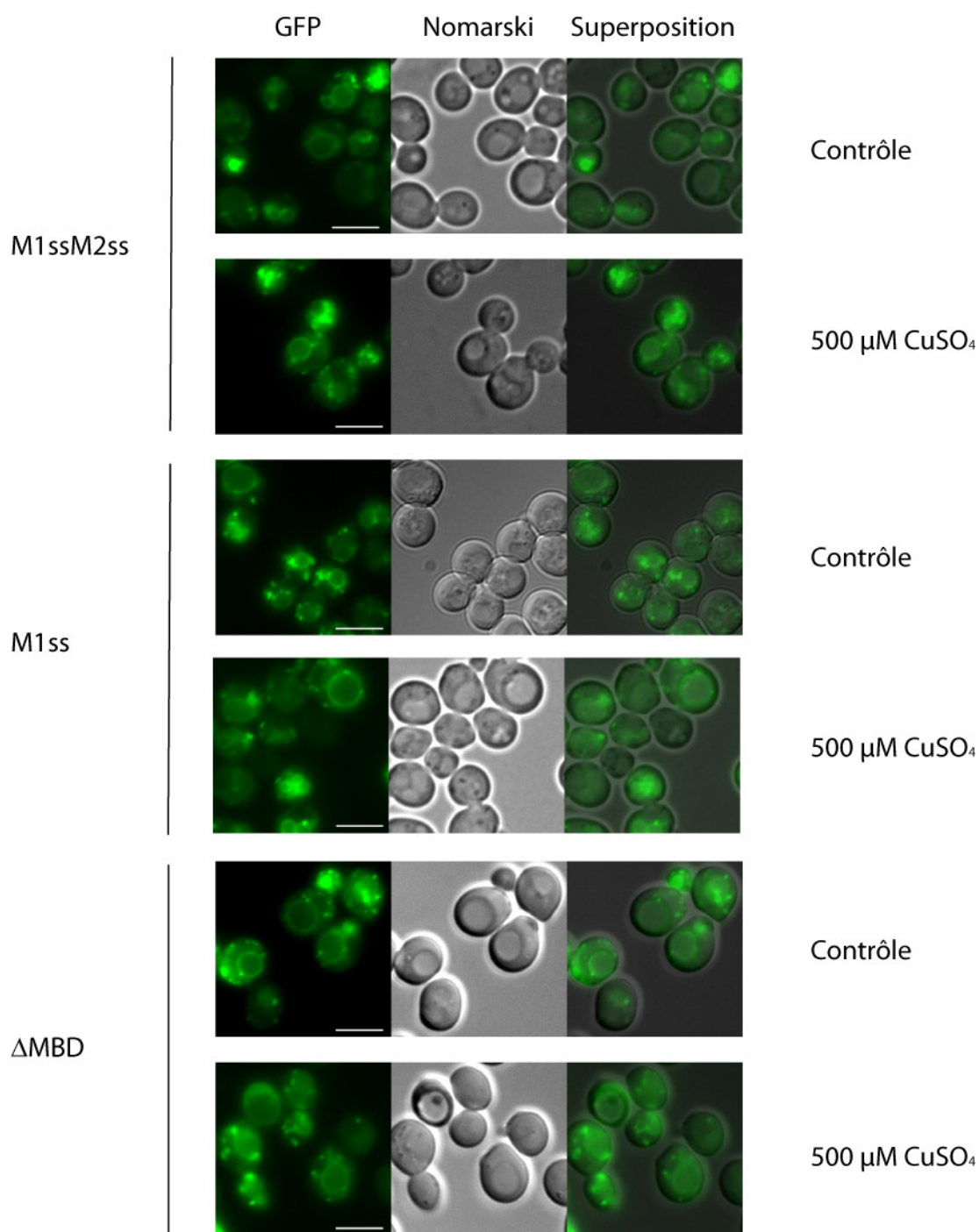


Figure R.1.15 : Localisation en milieu normal ou en présence de cuivre des mutants du N-terminal
(souche BY4741-ccc2 Δ transformée avec pCen-M1ssM2ssCcc2-GFP, pCen-M1ssCcc2-GFP ou pCen- Δ MBDCcc2GFP ; exposition de 2h au cuivre)

Ainsi que nous pouvons l'observer avec chacun de ces trois mutants, la migration de l'ATPase en présence de 500 μ M de cuivre est abolie par l'inactivation ou la suppression des MBD de Ccc2.

A l'issue de ces expériences, nous pouvons conclure que Ccc2 est une protéine résidant dans les membranes des compartiments de la voie sécrétoire et dans la membrane de la vacuole. La localisation de Ccc2 dans la voie sécrétoire est en accord avec son rôle physiologique connu dans l'approvisionnement en cuivre des enzymes de cette voie. A *contrario*, la présence de Ccc2 dans la membrane de la vacuole n'a jamais été décrite et son rôle à la vacuole reste à déterminer.

Nous avons également observé que la distribution intracellulaire de Ccc2 varie en fonction des concentrations en cuivre du milieu extracellulaire. Ainsi l'ajout de 500 μM de CuSO_4 dans le milieu de culture des levures, entraîne une redistribution de l'ATPase à la membrane de vésicules qui restent à identifier et sa disparition de la membrane de la vacuole.

Enfin nous avons pu montrer qu'à l'instar de ses homologues humaines, la phosphorylation auto-catalytique et la fixation du cuivre sur les MBD étaient cruciales pour le trafic de Ccc2. Ainsi une ATPase non phosphorylable ou dont le N-terminal est incapable de fixer le cuivre ne change pas de localisation en présence de cuivre, alors qu'à l'inverse une ATPase quasi constitutivement phosphorylée à une localisation strictement vésiculaire, ressemblant à celle de Ccc2 en présence de 500 μM de cuivre.

Dans le chapitre suivant, je me suis attaché à examiner le rôle physiologique de Ccc2 à la vacuole.

1.2. Etude du rôle de Ccc2 à la membrane de la vacuole.

Les ATPases de Wilson et de Menkes orthologues de Ccc2 dans les cellules humaines ont deux rôles connus et distincts. Le premier est de délivrer le cuivre aux enzymes de la voie sécrétoire et le second est un rôle de détoxification du cytosol en pompant le cuivre dans des vésicules restant à identifier, le cuivre étant ensuite éliminé par exocytose. Chez *S. cerevisiae*, Ccc2 n'a qu'un seul rôle connu qui est de délivrer le cuivre aux enzymes de la voie sécrétoire. Dans cette optique, il serait possible que sa localisation vacuolaire soit sa localisation finale après avoir délivré le cuivre à des enzymes vacuolaires telle que Fet5, l'oxidase à cuivre de la membrane de la vacuole homologue de Fet3 et impliquée dans le transporteur de fer de la membrane vacuolaire.

Une autre possibilité serait que Ccc2 se comporte de la même façon que les ATPases cuivre humaines et participe à la détoxification du cuivre. Afin de préciser le rôle de Ccc2 nous avons décidé d'étudier son activité à la membrane de la vacuole et son rôle potentiel dans la réponse de la cellule à une surcharge en cuivre.

1.2.1 Ccc2 participe-t-elle à l'import de cuivre dans la vacuole ?

1.2.1.1. Dosage du cuivre sur cellule entière.

Malgré le rôle connu de la vacuole dans l'homéostasie des métaux en général, nous n'avons que très peu d'informations quant au trafic du cuivre entre le cytoplasme et le lumen de la vacuole. En 2004, Rees et coll. ont mis en évidence le rôle du transporteur Ctr2 dans la mobilisation du cuivre intravacuolaire. A ce jour Ctr2 est le seul transporteur connu permettant la sortie du cuivre de la vacuole et aucun transporteur d'import n'a pour le moment été découvert.

Afin de mettre en évidence un rôle quelconque de Ccc2 dans l'accumulation du cuivre dans un compartiment intracellulaire, nous avons choisi dans un premier temps de réaliser des dosages de cuivre sur la souche BY4741 sauvage après 1h30 de culture (une génération) dans des milieux contenant des concentrations croissantes de cuivre. Nous avons comparé ces dosages à ceux des mutants *ccc2Δ*, *ctr2Δ* et *ccc2Δctr2Δ* (Matériels & Méthodes §3.5) dans les mêmes conditions.

En conditions normales, la souche sauvage BY4741 accumule $1,9 \times 10^{-7}$ ng de cuivre par cellule. Si nous rapportons ce résultat en nombre d'atomes de cuivre par cellule tel que présenté dans l'étude de l'ionome de la souche BY4743 par Eide et coll. (2005), nous obtenons une concentration de $1,8 \times 10^6$ atomes de cuivre par cellule. Ce résultat est proche de celui obtenu dans l'étude précédente de 3×10^6 atomes de cuivre par cellule. La différence de valeur peut s'expliquer par le fait que BY4743 est la souche diploïde parentale de la souche haploïde BY4741 et par les conditions de culture, l'étude précédente ayant été réalisée en milieu riche, alors que la nôtre l'a été en milieu synthétique. Globalement nous constatons que la concentration en cuivre dans les mutants est légèrement supérieure à celle de la souche sauvage (Figure R.1.16).

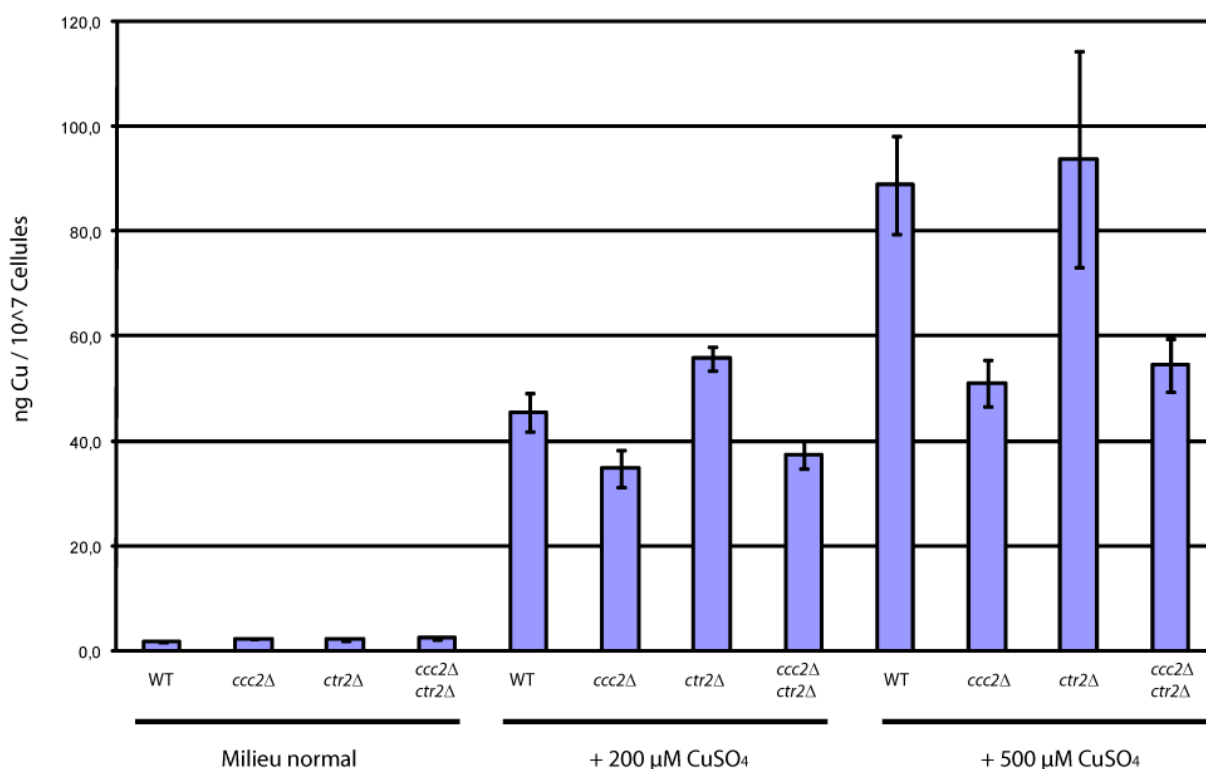


Figure R.1.16 : Dosage du cuivre contenu dans des levures exposées à des concentrations croissantes de cuivre. Les barres d'erreur sont présentées en SEM.

Le traitement des levures pendant 1h30 par 200 ou 500 μM de cuivre entraîne une forte augmentation de la quantité de cuivre dans les cellules pour atteindre près de 90×10^{-7} ng par cellule. A ces concentrations, la réponse des mutants varie nettement par rapport au type sauvage. En effet, alors que le mutant *ctr2Δ* accumule plus de cuivre que la souche sauvage à 200 μM, les mutants *ccc2Δ* et *ccc2Δ ctr2Δ* accumulent des concentrations significativement moindres que la souche sauvage ou la souche mutante *ctr2Δ*. A 500 μM la souche sauvage et

le mutant *ctr2Δ* contiennent la même quantité de cuivre et les souches *ccc2Δ* et *ccc2Δctr2Δ* restent à des concentrations significativement plus basses que les deux autres.

Ce résultat nous indique que Ccc2 participe à l'accumulation du cuivre dans un compartiment intracellulaire lorsque la levure est soumise à des concentrations croissantes de cuivre. De plus, à 200 μM , le mutant *ctr2Δ* accumule plus de cuivre que la souche sauvage, mais le mutant *ccc2Δctr2Δ* se comporte de la même façon que le mutant *ccc2Δ*. Ce résultat nous amène à penser que Ccc2 accumule du cuivre dans la vacuole. Enfin l'inactivation de Ccc2 entraînant une diminution de la quantité de cuivre contenu dans les cellules et non une augmentation, nous pouvons conclure que Ccc2 ne se comporte pas comme une pompe d'efflux en cas de surcharge de cuivre. Ce résultat corrobore ceux de microscopie puisque Ccc2 n'est jamais détectée à la membrane plasmique, ni même localisée à proximité de cette dernière.

1.2.1.2. Dosage de cuivre sur des vacuoles isolées.

Le dosage du cuivre sur cellule entière nous permet de penser que Ccc2 participe au stockage du cuivre dans la vacuole. Afin d'avoir une confirmation directe de cette hypothèse, nous avons dosé le cuivre sur des vacuoles isolées à partir de levures en phase exponentielle de croissance, traitées pendant 1h30 par 500 μM de cuivre.

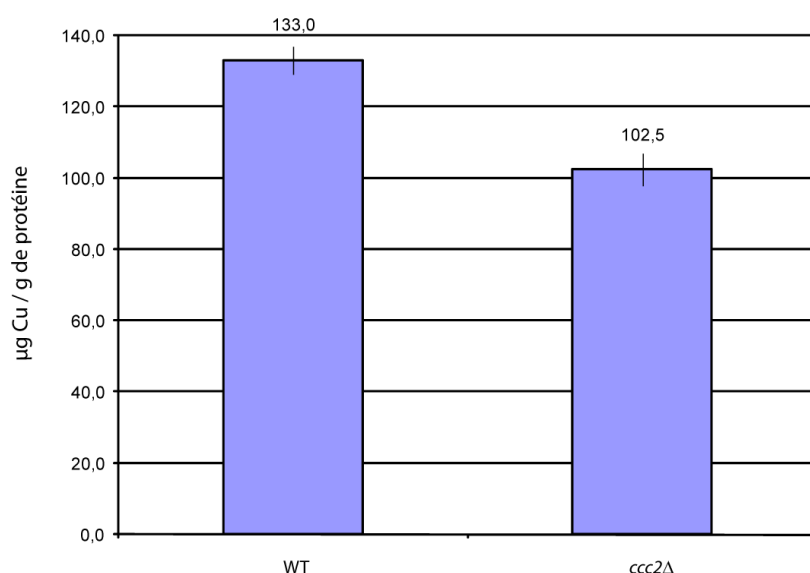


Figure R.1.17 : Dosage de cuivre sur des vacuoles isolées provenant de levures soumises à 500 μM de cuivre pendant 1h30. Les barres d'erreur sont présentées en SEM.

Les résultats sont normalisés et exprimés en μg de cuivre par gramme de protéines tels qu'ils sont présentés par Rees et coll. dans leur étude du rôle de Ctr2 (Rees et coll. 2004) (Figure R.1.17). Nous pouvons constater que la concentration en cuivre de la souche sauvage est bien plus élevée que dans l'étude sur Ctr2. Cette différence de résultat est certainement due à la différence des concentrations et temps d'exposition au cuivre dans nos conditions respectives. La quantité de cuivre vacuolaire de la souche *ccc2Δ* est significativement moindre que celle de la souche sauvage. Il apparaît donc clairement de ces expériences, que Ccc2 participe au stockage du cuivre dans la vacuole.

Ce résultat peut être expliqué par deux mécanismes distincts. Le premier implique un pompage direct du cuivre par Ccc2 à la membrane de la vacuole. Dans le second le cuivre est d'abord pompé dans des vésicules qui le déversent ensuite dans la vacuole en fusionnant avec la membrane vacuolaire. Au regard des données de localisation du chapitre précédent, cette deuxième hypothèse est la plus probable en présence de concentration de cuivre élevée dans le milieu de culture, et la première dans des conditions standards de culture.

1.2.2. Quel rôle physiologique pour Ccc2 dans un milieu riche en cuivre ?

Le premier rôle que joue Ccc2 dans le réseau trans-golgien est illustré par la sensibilité des levures *ccc2Δ* à la carence en fer et en cuivre. Ce phénotype est expliqué par la nécessité d'apporter du cuivre à Fet3 pour activer le transporteur de fer à haute affinité Ftr1 (Introduction §4.5). Etant donné le rôle de Ccc2 dans le stockage du cuivre à la vacuole, nous avons recherché l'impact de l'inactivation de Ccc2 dans une souche de levure soumise à une concentration élevée de cuivre. D'après Van Bakel et coll. (2005), l'inactivation de Ccc2 a pour effet de réduire la résistance au cuivre de la souche S288c. En effet cette dernière est sensible dès 2,5 mM CuSO_4 dans le milieu de culture contre 3 mM pour la souche sauvage. Afin d'étudier les motifs importants pour la fonction de Ccc2 dans ce contexte nous avons cherché à reproduire ce phénotype. En effet, Pca1, une ATPase de type P impliquée dans la résistance au cadmium de la levure, avait initialement été annotée comme une ATPase à cuivre car sa délétion entraîne également une augmentation de la sensibilité de la levure au cuivre (Rad et coll. 1994). Cependant il a été depuis démontré que ce phénotype est dû à la capacité du N-terminal de l'ATPase à séquestrer le cuivre et que cette dernière ne transporte pas le cuivre (De Freitas et coll. 2004; Adle et coll. 2007). Nous souhaitons donc savoir si le

phénotype observé par Van Bakel et coll. était dû à la capacité de Ccc2 de séquestrer le cuivre dans la vacuole ou simplement à la présence des MBD.

1.2.2.1. Phénotype associé à l'inactivation de Ccc2

Nous avons évalué l'impact de la délétion de Ccc2 dans un milieu contenant des concentrations croissantes de cuivre (Figure R.1.18).

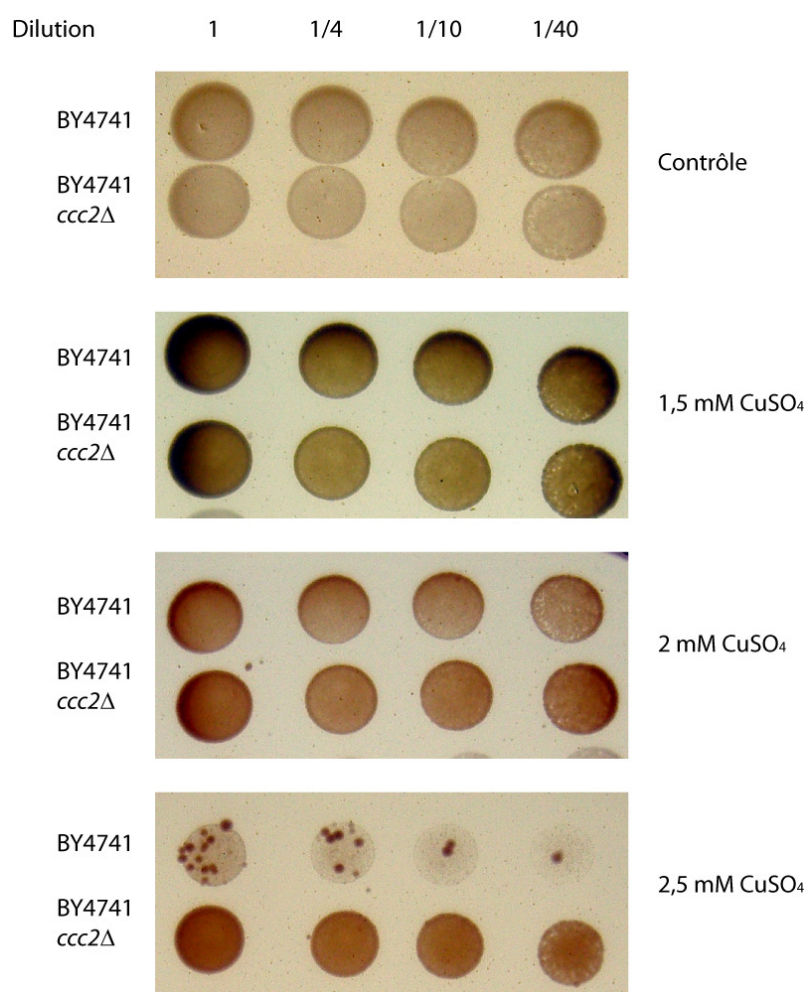


Figure R.1.18 : Effet du cuivre sur la croissance de la souche BY4741 sauvage et *ccc2Δ*

De façon surprenante, c'est le phénotype opposé que nous avons obtenu pour la souche BY4741 *ccc2Δ* qui résiste beaucoup mieux à 2,5 mM de cuivre que la souche sauvage. Pour confirmer ce résultat, nous avons testé la souche *ccc2Δ* construite au laboratoire par Isabelle Morin à partir de la souche YPH499 (Morin 2005) et la souche *ccc2Δ* également

construite au laboratoire par Jennifer Lowe à partir de la souche W303 (Lowe et coll. 2004). Le même phénotype a été observé pour les 3 souches (Figure R.1.19).

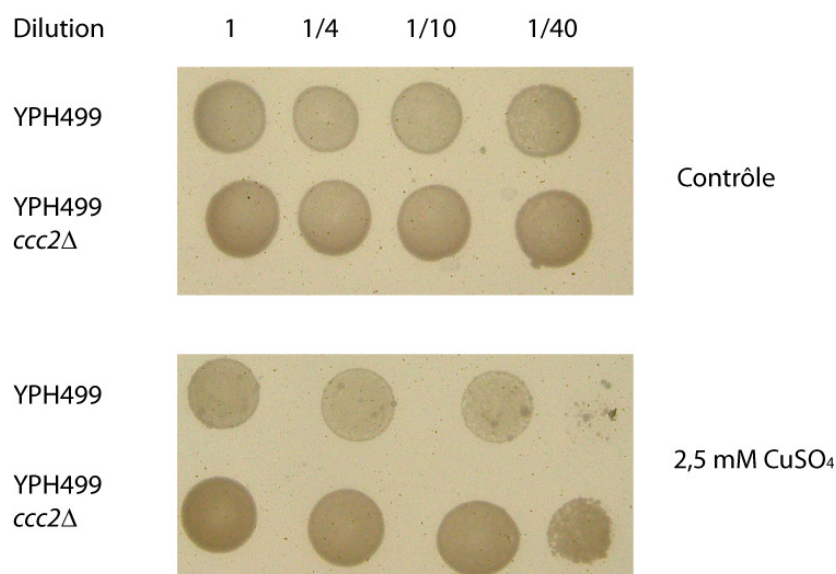


Figure R.1.19 : Effet du cuivre sur la croissance de la souche YPH499 sauvage et *ccc2Δ*.

La complémentation d'un phénotype de sensibilité au cuivre chez la levure nécessite quelques précautions. En effet, le métabolisme de l'histidine (Pearce et Sherman 1999) et celui du tryptophane (Jo et coll. 2008) participent à la résistance au cuivre de la levure. L'inactivation ou le rétablissement de leur voie de biosynthèse entraîne une diminution ou une augmentation de la résistance au cuivre de la souche. Dans nos conditions, l'utilisation d'un plasmide vide exprimant les marqueurs de sélection rétablissant la synthèse de l'histidine ou du tryptophane a pour effet de masquer l'augmentation de la sensibilité de la souche *ccc2Δ* au cuivre. Le plasmide utilisé pour exprimer Ccc2-GFP portant le gène *LEU2*, nous l'avons utilisé pour reverser le phénotype de la souche BY 4741 *ccc2Δ*.

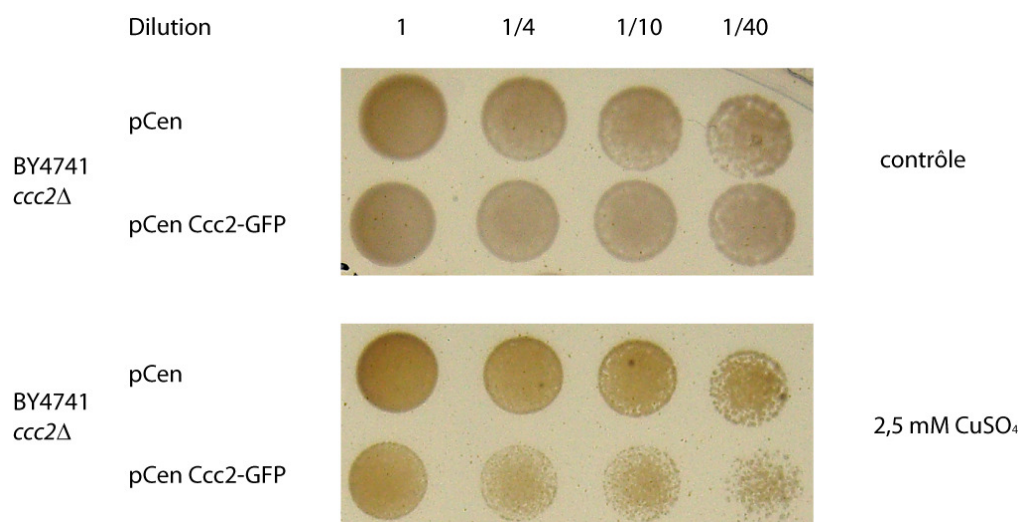


Figure R.1.20 : Effet du cuivre sur la croissance de la souche BY4741 *ccc2Δ* en présence d'un plasmide vide ou exprimant Ccc2-GFP

Ainsi que le montre la figure R.1.20 le plasmide vide ne modifie pas la résistance de la souche à 2,5 mM. Par contre, l'expression de Ccc2 par pCen-Ccc2-GFP rend la souche plus sensible au cuivre.

La présence de Ccc2 est donc toxique pour la cellule lorsque les concentrations deviennent trop élevées dans le milieu de culture. Ce résultat est contre-intuitif de prime abord. En effet la suppression de transporteurs de métaux dans la vacuole comme Ycf1 (Szczypka et coll. 1994 ; Wemmie et coll. 1994) ou encore Cot1 (Conklin et coll. 1992) a pour effet d'augmenter la sensibilité de la levure au métal transporté. Nous ne pouvons cependant pas exclure que l'accumulation de cuivre soit toxique. Une autre hypothèse pourrait expliquer ce phénotype si nous considérons les dosages de cuivre sur cellule entière de la souche sauvage et de la souche *ccc2Δ* (Figure R.1.16). Cette dernière contient moins de cuivre que la souche sauvage. Nous pouvons donc supposer que la levure ne pouvant stocker le cuivre dans la vacuole, la concentration dans le cytosol atteindrait plus rapidement le seuil déclenchant les mécanismes de protection contre le cuivre. La résistance observée de la souche *ccc2Δ* serait donc due à une prise en charge plus précoce du stress cuivre par la cellule.

1.2.2.2. Motif responsable de la toxicité de Ccc2.

Afin de distinguer le rôle des MBD du rôle de l'activité catalytique dans ce phénotype, différents mutants ont été testés :

- M1ssM2ssCcc2 est une protéine dont les MBD sont rendus incapables de lier le cuivre par le remplacement des cystéines du motif CxxC en sérines. Ce mutant n'est pas phosphorylable *in vitro* en présence du seul cuivre contaminant et il ne restaure pas le phénotype sauvage d'une souche *ccc2Δ* *in vivo* dans un milieu carencé en fer et en cuivre (Morin 2005)
- ΔMBDCcc2 est une protéine tronquée de ses MBD. Ce mutant est phosphorylable *in vitro* en présence du seul cuivre contaminant ; il ne complémente pas une souche *ccc2Δ*, mais complémente une souche *ccc2Δatx1Δ* dans laquelle un MBD indépendant est co-exprimé.
- Ccc2-D627A est une protéine dont l'acide aspartique du motif de phosphorylation D⁶²⁷KTGT est muté en alanine rendant impossible la phosphorylation auto-catalytique de la protéine. La protéine est donc constitutivement inactive.
- Ccc2-TGE-AAA est une protéine dont le motif TGE est muté en alanines. La protéine présente un défaut dans l'étape de déphosphorylation. *In vitro* cette mutation se traduit par un défaut de déphosphorylation de l'ATPase et *in vivo* par une incapacité à compléter une souche *ccc2Δ* dans un milieu carencé en fer et en cuivre.

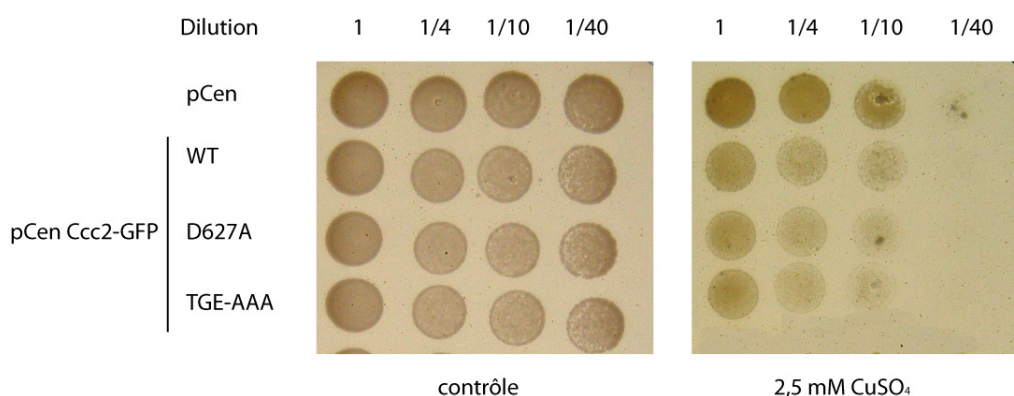


Figure R.1.21 : Croissance de la souche BY4741 *ccc2Δ* sur un milieu riche en cuivre en présence de mutants de Ccc2 – influence de l'activité catalytique
(souche transformée par les plasmides indiqués)

L'expression des mutants de Ccc2 sans activité catalytique dans la souche *ccc2Δ* restaure le phénotype sauvage de sensibilité au cuivre (Figure R.1.21). Le phénotype lié à l'expression de Ccc2 ne serait donc pas dû à l'activité catalytique de la protéine.

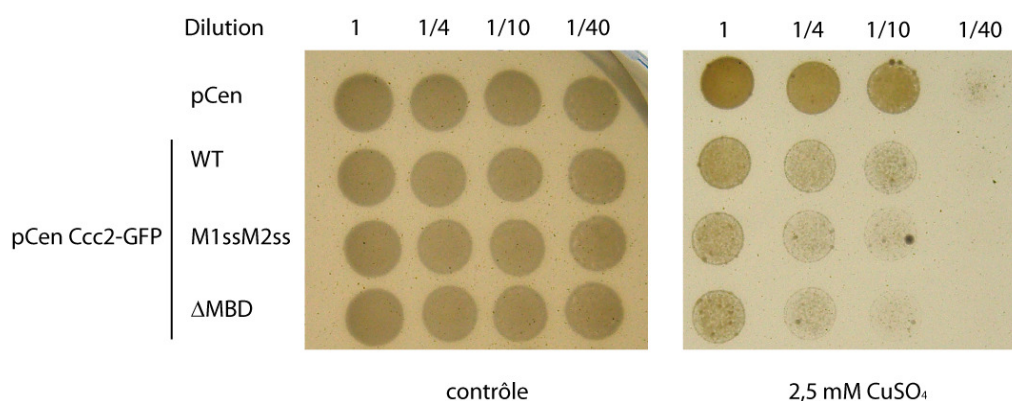


Figure R.1.22 : Croissance de la souche BY4741 *ccc2Δ* sur un milieu riche en cuivre en présence de mutant de Ccc2 – influence de la fixation du cuivre aux MBD
(souche transformée par les plasmides indiqués)

L'expression des mutants de Ccc2 incapables de fixer le cuivre sur les MBD restaure également le phénotype sauvage de la souche (Figure R.1.22). La liaison du cuivre sur les MBD ne semble pas non plus être la cause de la sensibilité au cuivre liée à la présence de Ccc2.

D'après ces tests phénotypiques, ni la capacité de fixer le cuivre par les MBD, ni l'activité catalytique de Ccc2 ne semblent être responsables du phénotype observé. D'après les données précédentes la plus grande sensibilité au cuivre de la souche exprimant Ccc2 est due à une suraccumulation de cuivre par ces cellules. Or si l'ATPase n'est pas catalytiquement active, elle ne devrait plus accumuler de cuivre dans la cellule, et si le modèle selon lequel Ccc2 acquiert le cuivre qu'elle transporte au niveau de ses MBD par interaction avec Atx1 est vérifié, alors les mutants Δ MBD ou M1ssM2ss ne devraient pas non plus accumuler de cuivre dans la cellule.

Afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une suraccumulation toxique de cuivre en présence de Ccc2, nous avons réalisé le dosage du cuivre dans des levures *ccc2Δ* exprimant les différents mutants (Figure R.1.23).

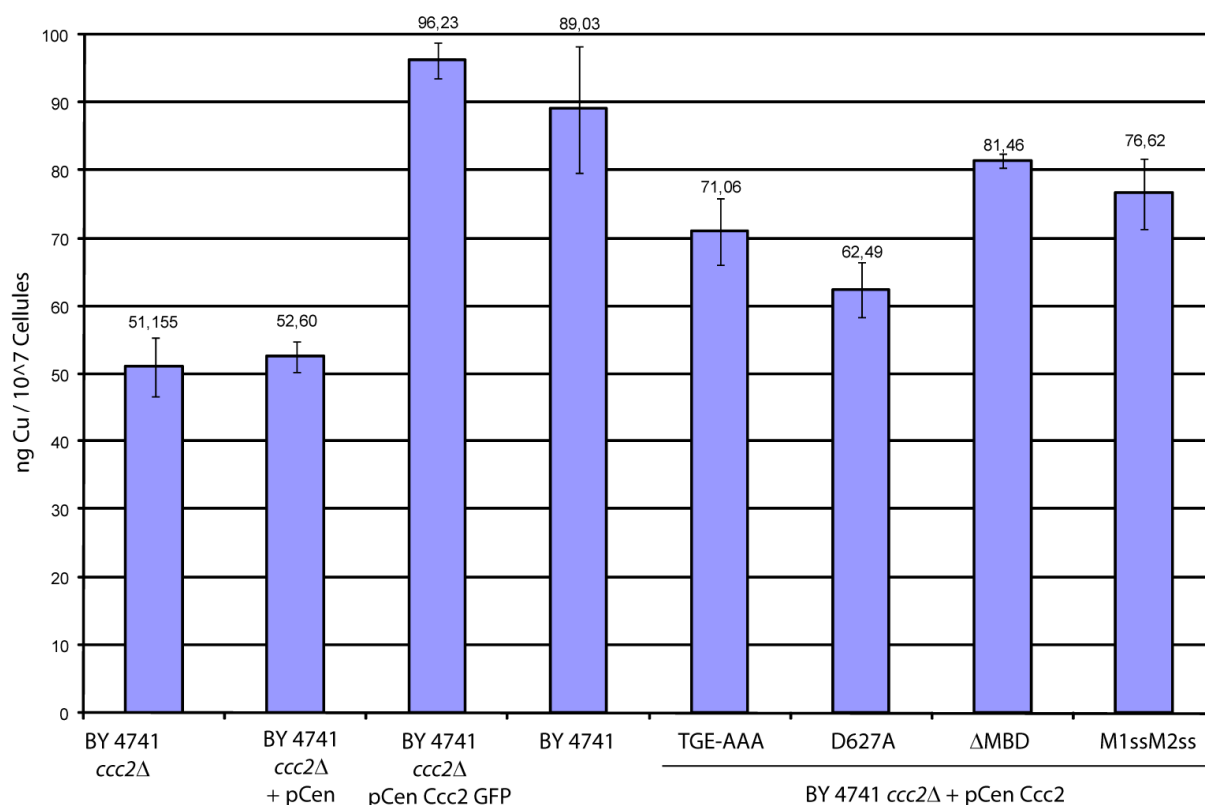


Figure R.1.23 : Dosage du cuivre contenu dans la souche BY4741 *ccc2Δ* exprimant différents mutants de Ccc2 et exposées à 500 μ M de cuivre pendant 1h30. Les barres d'erreur sont présentées en SEM. (La souche sauvage figure pour comparaison)

Le dosage en présence du plasmide vide nous indique que la présence de ce dernier et la restauration de la voie de synthèse de la leucine n'ont pas d'influence sur la quantité de cuivre dans la levure. La transformation de cette souche avec le plasmide exprimant Ccc2-GFP permet de restaurer l'accumulation du cuivre à un niveau comparable à celui de la souche sauvage.

Afin de pouvoir comparer les quantités de cuivre entre les différentes souches, nous avons vérifié que les niveaux d'expression des mutants de Ccc2 étaient équivalents. L'immunodétection des protéines étiquetées par la GFP montre qu'il n'y a pas de variation d'expression notable parmi les différents mutants (Figure R.1.24).

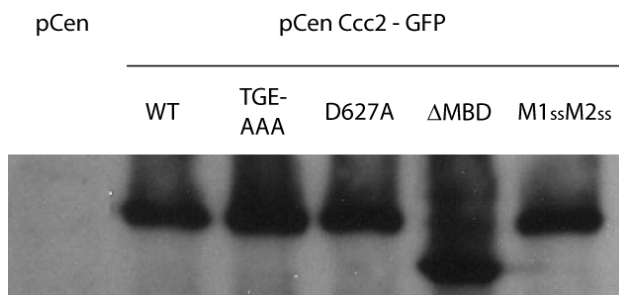


Figure R.1.24 : Immunodétection des mutants de Ccc2 exprimés par le plasmide pCen-Ccc2-GFP (révélation à l'aide d'un anticorps contre la GFP)

Quelque soit le mutant testé, la quantité de cuivre mesurée dans la souche est inférieure à celle mesurée dans la souche exprimant la protéine Ccc2 sauvage. Cependant, elle reste largement supérieure à la quantité de cuivre mesurée dans la souche *ccc2Δ*, et reste visiblement suffisante pour observer le même phénotype que celui obtenu avec la protéine sauvage dans nos conditions. Ce test phénotypique n'est donc pas suffisamment sensible pour permettre de corréler les défauts d'accumulation du cuivre dans la cellule avec un phénotype plus ou moins prononcé. On pourra noter que la souche exprimant le mutant constitutivement inactif Ccc2-D627A contient à peine plus de cuivre que la souche transformée par le plasmide vide, ce qui laisse penser qu'il existerait un effet seuil de la concentration intracellulaire du cuivre au-delà de laquelle cette dernière devient toxique.

La capacité à séquestrer le cuivre est généralement associée à une augmentation de la résistance. Nous pouvons citer, pour mémoire, le rôle du N-terminal de Pca1 (Adle et coll. 2007) ou le rôle des métallothionéines dans la résistance de la levure au cuivre (Winge et coll. 1985). Cependant nous pouvons noter que le cuivre se liant aux métallothionéines n'est pas échangeable, contrairement à celui fixé aux MBD de Ccc2. Il est donc possible que le caractère échangeable du cuivre lié aux MBD explique sa toxicité.

L'analyse plus fine des différents mutants est hasardeuse eu égard à la variabilité de la mesure qui peut atteindre 10% de la valeur. Néanmoins, elle nous apporte des informations qualitatives sur la part que prennent dans l'accumulation du cuivre l'activité de transport d'une part et les MBD d'autre part (Figure R.1.25).

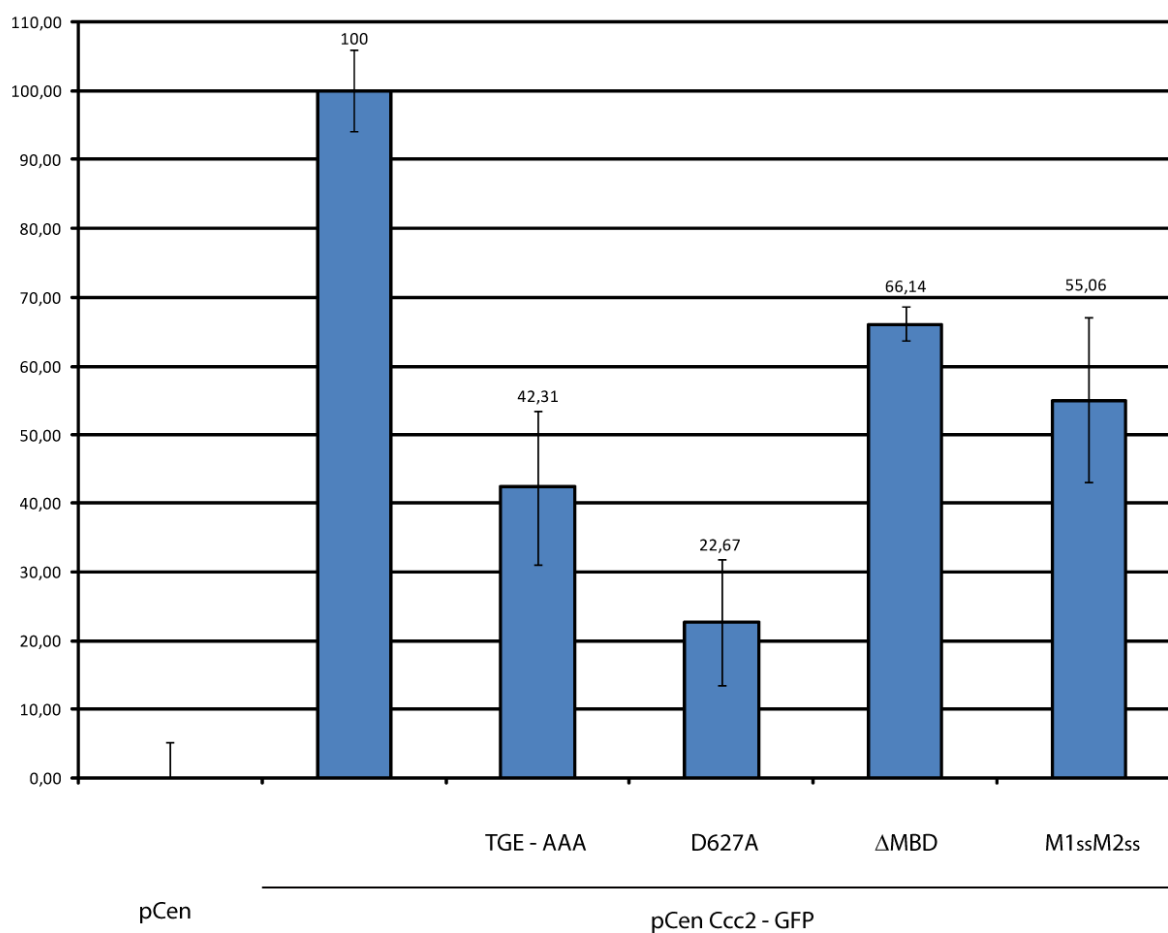


Figure R.1.25 : Quantité de cuivre présente dans les levures exprimant les différents mutants de Ccc2 par rapport aux levures exprimant Ccc2 sauvage
(souche BY4741 *ccc2Δ* transformée par les plasmides indiqués)

Le mutant Ccc2-D627A, catalytiquement inactif et incapable de transporter le cuivre de part et d'autre de la membrane, accumule 20 à 30 % plus de cuivre que la souche *ccc2Δ*, et donc 70 à 80 % de moins que la souche *ccc2Δ* transformée avec pCen-Ccc2-GFP. Au contraire, la protéine ΔMBDCcc2, dépourvue de ses MBD mais catalytiquement active accumule 60 à 70 % plus de cuivre que la souche *ccc2Δ* et 30 à 40 % de moins que la souche *ccc2Δ* transformée avec pCen-Ccc2-GFP. La corrélation entre ces deux protéines est troublante. En effet, la souche exprimant la protéine sans MBD présente un défaut d'accumulation correspondant approximativement à ce qui est accumulée par celle exprimant une protéine dont les MBD sont intacts, mais sans activité de transport. Et réciproquement la protéine sans activité de transport présente un défaut d'accumulation correspondant approximativement à ce qui est accumulée par celle exprimant une protéine sans MBD. De ce fait il est tentant de conclure que les MBD représentent dans nos conditions expérimentales

30 % de la quantité de cuivre stocké dans la levure et que l'activité de transport est responsable des 70 % restant.

Les levures exprimant les mutants M1ssM2ssCcc2 et Ccc2-TGE-AAA présentent des profils intermédiaires par rapport aux deux précédents mutants. Le mutant M1ssM2ssCcc2 accumule significativement plus de cuivre que le mutant Ccc2-D627A. Pourtant d'après la thèse d'Isabelle Morin (Morin 2005) cette protéine n'est pas phosphorylée par le cuivre contaminant *in vitro* et ne complète pas *in vivo* une souche *ccc2Δ* dans un milieu carencé en fer et en cuivre. La protéine M1ssM2ssCcc2 ne serait pas fonctionnelle dans ces conditions à cause d'un blocage de la protéine dans une conformation inactive. En effet l'équipe de Lutsenko a montré qu'il existe une interaction dépendante du cuivre entre le N-terminal et la grande boucle nucléotidique de l'ATPase de Wilson (Tsivkovskii et coll. 2001). La liaison du cuivre sur les MBD activerait l'ATPase par rupture de cette interaction. M1ssM2ssCcc2 ne serait donc pas fonctionnelle car ses MBD ne peuvent fixer le cuivre et donc l'ATPase reste dans une conformation inactive. Cependant la quantité de cuivre présente dans la souche BY4741 *ccc2Δ* est de $2,3 \pm 0,1 \text{ ng} / 10^7$ cellules en condition basale pour $51 \pm 4 \text{ ng} / 10^7$ cellules dans le milieu contenant $500 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Cette variation représente une augmentation de plus de 2000 % de la quantité de cuivre totale. Il est donc envisageable qu'un tel excès de cuivre dans la cellule puisse entraîner un déblocage partiel de la protéine et donc son activation, ce qui expliquerait la quantité de cuivre mesurée ici.

Le mutant Ccc2-TGE-AAA n'est significativement différent ni du mutant M1ssM2ssCcc2, ni du mutant Ccc2-D627A. Sur l'ATPase à calcium Serca1a, la mutation de l'un des acides aminés du motif TGE entraîne une perte de 95 % de l'activité de transport due à une forte inhibition de l'hydrolyse du phosphorylenzyme (Anthonisen et coll. 2006). Il est donc possible que l'accumulation observée soit la résultante d'une activité de transport résiduelle comme celle observée pour Serca1a et de la fixation du cuivre sur les MBD.

En résumé, nous avons montré dans ce chapitre que Ccc2 participe activement au stockage du cuivre dans la vacuole. En effet, son inactivation provoque une diminution de la quantité de cuivre contenu dans la cellule qui, selon les conditions de culture, peut atteindre la moitié de la quantité présente dans une levure sauvage.

Nous avons ensuite tenté de corréler ce rôle dans le stockage du cuivre à un phénotype associé à l'inactivation de Ccc2, mais nous avons constaté que cette dernière renforçait la

tolérance de la levure aux fortes concentrations de cuivre ; l'accumulation de cuivre due à Ccc2 est donc néfaste à ces concentrations.

Finalement, nous avons souhaité déterminer si cette toxicité était due à l'activité catalytique et donc au stockage dans un compartiment cellulaire proprement dit, ou si elle était due au cuivre fixé sur les MBD. Les tests phénotypiques et les dosages de cuivre sur les levures *ccc2Δ* exprimant des mutants catalytiquement inactifs ou bien incapables de fixer du cuivre sur leurs MBD nous montrent que les deux composantes pourraient participer au phénotype observé.

1.3. Discussion

L'utilisation combinée de la biochimie et de la microscopie de fluorescence, nous a permis de préciser la localisation de Ccc2. Nous avons ainsi confirmé par des expériences de localisation en présence de marqueurs spécifiques des différents compartiments de la levure, la présence de Ccc2 dans l'appareil de Golgi, le réseau trans-Golgien et les endosomes. Nous avons également observé la présence de Ccc2 à la membrane de la vacuole, ce qui n'avait jamais été décrit jusqu'ici. Enfin nous avons mis en évidence que la distribution intracellulaire de Ccc2 était sensible à la concentration de cuivre dans le milieu de culture, et qu'en présence de 500 μ M de cuivre, elle disparaissait de la membrane de la vacuole pour une répartition strictement vésiculaire. Nous n'avons pas été en mesure de préciser la nature de ces vésicules, malgré nos efforts.

Dans cette première partie, je m'attacherai à discuter la distribution intracellulaire de Ccc2 et ses conséquences.

1.3.1. Localisation et adressage de Ccc2

Les expériences de colocalisation de Ccc2 en présence de protéines cibles des différents compartiments intracellulaires nous apprennent que Ccc2 est présente dans les compartiments de la voie sécrétoire que sont l'appareil de Golgi, le Golgi tardif et les endosomes (Résultats §1.1.1.2 et §1.1.2.1). Cette répartition dans les différents organites n'est peut-être pas uniquement la manifestation du transit de Ccc2 vers un compartiment final. En effet, elle pourrait être importante pour l'acquisition du cuivre par les enzymes de la voie sécrétoire. Ainsi Yuan et coll. montrent que de nombreux gènes impliqués dans la voie de transport des vésicules vers la vacuole, la voie vps, sont importants pour l'acquisition du cuivre par Fet3 (Yuan et coll. 1997). Les protéines importantes pour la métallation de Fet3 sont principalement liées à la fusion des vésicules aux endosomes et à la vacuole (vps3 ; 6 ; 9 ; 11 ; 16 ; 18 ; 19 ; 33 et 45), des protéines du complexe ESCRT indispensable au transport des vésicules entre les MVB et la vacuole (vps2 ; 4 ; 20 ; 24 et 27) ou encore des protéines nécessaires au transport rétrograde entre les endosomes et le Golgi tardif (vps5 ; 15 ; 29 ; 30 ; 34 et 35). Cette importance des protéines de la voie vps dans l'acquisition du cuivre par Fet3 nous indique que Ccc2 accompagne Fet3 au cours de son transit dans la voie sécrétoire. Le cuivre n'est donc probablement pas délivré à Fet3 dans le seul appareil de Golgi. De plus,

l'intervention de protéines du rétromère dans l'acquisition du cuivre par Fet3 plaide pour un recyclage constant de Ccc2 entre l'appareil de Golgi et la vacuole.

L'importance de ce co-transit est peut être une caractéristique des ATPases à cuivre. Un article paru dans *Nature* en août 2008 vient conforter l'idée selon laquelle certaines enzymes à cuivre doivent être accompagnées jusqu'à leur compartiment final de résidence par l'ATPase qui leur délivre le métal (Setty et coll. 2008). Ainsi dans les mélanocytes de souris, la tyrosinase à cuivre doit être accompagnée par ATP7A, l'homologue murin de Ccc2, tout le long de la voie d'acheminement de l'enzyme vers son compartiment final, le mélanosome. Les auteurs de cette étude montrent que la tyrosinase acquiert une première fois le cuivre dans le réseau trans-golgien. Cependant le caractère labile de la liaison cuivre – protéine et probablement des conditions peu favorables dans les vésicules de transport provoquent la perte du cuivre par la tyrosinase, qui doit être rechargée en cuivre dans le mélanosome pour y exercer sa fonction.

Il apparaît donc que Ccc2 est une protéine résidente de la voie sécrétoire et que cette localisation dans les différents compartiments est importante pour son rôle dans la cellule.

1.3.2. Une nouvelle localisation pour Ccc2

L'amélioration des techniques nous a permis de mettre en évidence la présence de Ccc2 à la membrane de la vacuole, ce qui n'avait jamais été décrit auparavant (Résultats §1.1.1). Le rôle physiologique de Ccc2 à la membrane de la vacuole sera discuté plus loin. Nous nous attacherons ici à l'adressage et au trafic de Ccc2 à la membrane de la vacuole.

Bien qu'inattendue, cette localisation vacuolaire de Ccc2 est en accord avec les premières observations de Yuan et coll. (1997). En effet, ces derniers montrent une implication des voies d'adressage à la membrane de la vacuole dans l'acquisition du cuivre par Fet3. De plus, ils décrivent la localisation de Ccc2 dans des vésicules adjacentes à la membrane de la vacuole. Or la technique d'immunofluorescence impose préalablement de fixer et perméabiliser les levures. Cette préparation peut entraîner des artefacts, notamment un épaississement du signal issu des protéines de la membrane vacuolaire et il devient difficile d'identifier la membrane de la vacuole, qui peut être confondue avec des vésicules adjacentes à la membrane vacuolaire. La figure D.1.1 illustre ce phénomène.

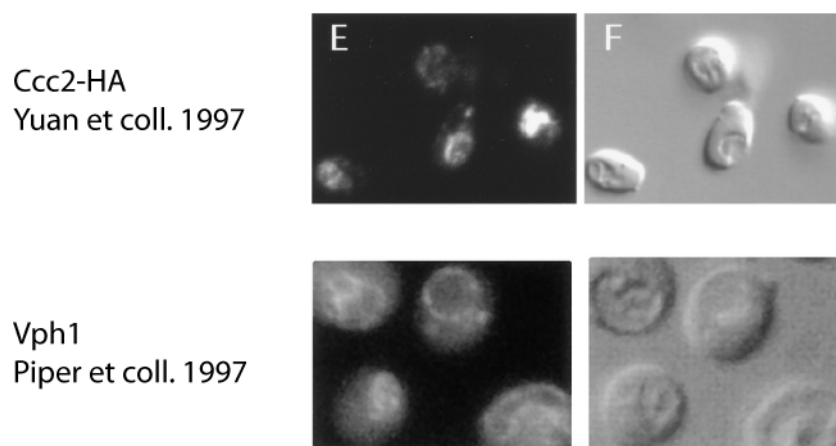


Figure D.1.1 : Localisation de Ccc2 et de Vph1 par immunofluorescence

Le marquage de Vph1, la sous-unité membranaire de l'ATPase à protons de la membrane de la vacuole de *S. cerevisiae*, dans cette publication de Piper et coll. (1997) ressemble de manière flagrante au marquage de Ccc2 observé par Yuan et coll. (1997).

Nous montrons cependant que la voie vps, n'est pas la seule voie empruntée par Ccc2 pour atteindre la membrane de la vacuole puisqu'elle est toujours correctement localisée dans un mutant *vps27*. Ccc2 emprunte probablement aussi la voie AP-3 (figure R.1.9). La voie endocytaire est certainement à exclure car aucun marquage n'a été observé à la membrane plasmique, que ce soit dans la souche sauvage ou dans le mutant *end3Δ* où l'endocytose est bloquée. De plus les seuls mutants sec de la voie sécrétoire qui entravent l'acquisition du cuivre par Fet3 sont les mutants qui bloquent le transit des vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et entre les différents compartiments de l'appareil de Golgi (*sec7* ; 18 ; 21 ; 23 et 53), alors que ni le mutant *sec1*, qui empêche la fusion des vésicules à la membrane plasmique, ni le mutant *sec4*, qui inhibe le transport de ces vésicules vers la membrane plasmique n'affectent l'acquisition du cuivre par Fet3 (Yuan et coll. 1997).

1.3.3. Effets du cuivre sur la distribution intracellulaire de Ccc2

La localisation de Ccc2 est sensible à la concentration de cuivre du milieu extracellulaire. L'exposition des levures à des concentrations élevées en cuivre (supérieures à 500 μ M) pendant 2h fait disparaître Ccc2 de la membrane de la vacuole. Cette disparition n'est probablement pas due à une dégradation sélective de la protéine présente à la membrane de la vacuole ou à une diminution de traduction de Ccc2. En effet nous avons vérifié par immunodétection que ni le niveau de Ccc2 endogène, ni le niveau de Ccc2 produit par le

plasmide pCen-Ccc2-GFP ne sont affectés par la présence de 500 μM de cuivre dans le milieu de culture (Résultats §1.2.2.2). L'étude de souches dont sont bloquées les voies de l'endocytose, de la CPY et l'ALP nous apprend que le changement de localisation de Ccc2 en présence de cuivre implique les voies CPY et ALP, mais pas la voie endocytaire. Ce résultat confirme que Ccc2 emprunte la voie directe de l'ALP et la voie plus indirecte de la CPY pour atteindre la membrane de la vacuole (Résultats §1.1.4).

1.3.4. Motifs de Ccc2 influençant la distribution intracellulaire de Ccc2

La sensibilité au cuivre de la localisation intracellulaire de Ccc2 est une caractéristique que cette ATPase partage avec les ATPases à cuivre humaines ATP7A et ATP7B (Petrakis et coll. 1996; Hung et coll. 1997). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la littérature sur les ATPases humaines est abondante et parfois contradictoire. Par exemple, le rôle des MBD du N-terminal dans la sensibilité au cuivre de la localisation d'ATP7A diffère selon le modèle cellulaire (Goodyer et coll. 1999; Strausak et coll. 1999). Par ailleurs, il est admis que le cycle catalytique doit être fonctionnel pour que la concentration extracellulaire de cuivre induise le déplacement des ATPases humaines (Petrakis et coll. 2002; Cater et coll. 2006). Les difficultés proviennent donc de ce que pour chaque mutation entraînant un défaut de trafic d'ATP7A ou ATP7B, il faut vérifier s'il ne s'agit pas d'un effet secondaire qui ne serait que la conséquence d'un défaut dans le cycle catalytique de l'ATPase. Pour cela, la fonctionnalité de l'ATPase est testée de diverses manières selon les auteurs, par exemple par sa capacité à remplacer Ccc2 dans une souche *ccc2Δ* (Forbes et coll. 1999), par sa capacité à accumuler du cuivre dans des vésicules (Voskoboinik et coll. 1998) ou encore à fournir du cuivre à la tyrosinase dans des fibroblastes de malades (Guo et coll. 2005). La complexité de ces données a contribué à notre choix d'utiliser Ccc2 comme modèle des ATPases humaines pour trouver un mécanisme commun gouvernant la sensibilité au cuivre de la localisation intracellulaire des ATPases à cuivre eucaryotes. Nous nous sommes donc focalisé sur les motifs responsables de la sensibilité au cuivre en utilisant la levure comme modèle cellulaire unique et simplifié.

Un élément important du trafic des ATPases à cuivre est l'intégrité du cycle catalytique. La substitution d'un acide glutamique à la place de l'acide aspartique du motif DKTGT est connue pour inhiber constitutivement la phosphorylation auto-catalytique de l'ATPase à calcium (Maruyama et MacLennan 1988). Cette mutation rend les ATPases à cuivre insensibles au cuivre extracellulaire. En effet, celles-ci restent bloquées dans le réseau

trans-golgien quelle que soit la concentration en cuivre dans le milieu extracellulaire (Résultats §1.5.1 pour Ccc2, Petris et coll. (2002) pour ATP7A et Cater et coll. (2006) pour ATP7B). *A contrario*, l'inhibition de la déphosphorylation par la substitution d'alanines aux acides aminés du motif TGE qui facilite la réaction de déphosphorylation rend l'ATPase à calcium quasi constitutivement phosphorylée (Anthonisen et coll. 2006). Les ATPases à cuivre ainsi modifiées sont localisées dans le compartiment vésiculaire où elles se regroupent lorsque la concentration en cuivre s'élève, même si le milieu extracellulaire ne contient que des micromolaires de cuivre (Résultats §1.5.1 pour Ccc2, Petris et coll. (2002) pour ATP7A et Cater et coll. (2007) pour ATP7B). L'intérêt du mutant TGE-AAA est que l'inhibition de la déphosphorylation n'est pas totale, comme le suggère le fait que Ccc2-TGE-AAA accumule plus de cuivre que Ccc2-D627A (Résultats §1.2.1). Cette inhibition partielle se traduit au niveau du trafic d'ATP7B et de Ccc2 par la possibilité de forcer leur retour dans leur localisation basale par l'application aux cellules d'une forte carence en cuivre (Résultats §1.5.1, Cater et coll. 2007). Ces résultats suggèrent que le phosphorylenzyme est un élément central du trafic des ATPases à cuivre. Cependant nous pouvons nous demander si cette phosphorylation est un signal direct pour la machinerie cellulaire. Comme l'ont proposé Cater et coll. en 2007, le mutant TGE-AAA pourrait se révéler un outil précieux. En effet, la découverte d'une ou plusieurs mutations qui, associées à ce mutant, inhiberaient le trafic de l'ATPase, révélerait un site responsable du contrôle du trafic intracellulaire de la protéine. A la recherche d'un tel site, ces auteurs montrent que ni le motif CPC, ni les MBD d'ATP7B ne sont responsables de la sensibilité au cuivre de la localisation du mutant TGE-AAA.

Au cours de ma thèse, j'ai montré que les mutants Ccc2-D627A, Ccc2-TGE-AAA, M1ssM2ssCcc2 et Δ MBDCcc2 se comportaient comme leurs homologues d'ATP7B (Résultats §1.5). La protéine M1ssM2ssCcc2-TGE-AAA, ainsi que celle portant toutes ces mutations et celles du motif CPC-SPS ont été construites, mais nous avons rencontré des problèmes d'expression qui ne nous permettent pas de présenter de résultats dans ce manuscrit. Si ces protéines montrent la même sensibilité au cuivre que Ccc2-TGE-AAA, alors tous les sites à cuivre connus de Ccc2 auront été testés sans succès. Nous pourrions alors utiliser Ccc2 pour chercher un autre site à cuivre responsable de la sensibilité au cuivre de sa localisation. Plusieurs motifs susceptibles de fixer le cuivre ont déjà été identifiés dans la littérature.

Le premier motif est situé au niveau des hélices transmembranaires TM7 et 8. Ces hélices contiennent une séquence Y⁹⁰⁸N⁹⁰⁹ (TM7) M⁹³⁶xxxS⁹⁴⁰ (TM8) qui est très conservée chez les ATPases à cuivre (Argüello 2003). D'après une étude réalisée sur CopA d'*A. fulgidus*,

cette séquence participe à la coordination du cuivre dans les membranes avec les acides aminés du motif CPC et la mutation des acides aminés Y, N, M ou S entraîne une inhibition de la phosphorylation auto-catalytique de l'ATPase (Mandal et coll. 2004).

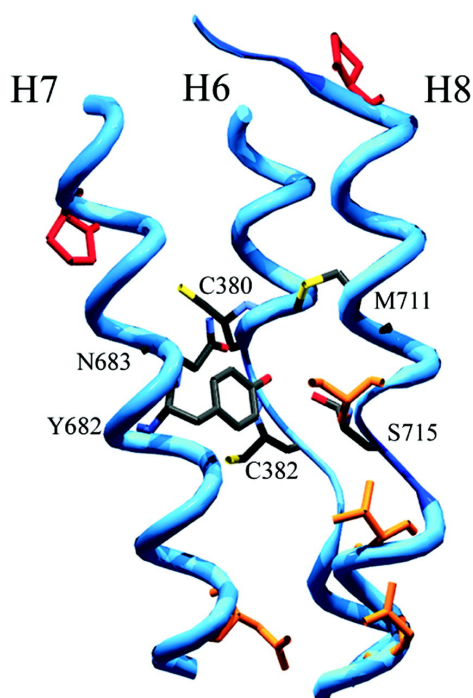


Figure D.1.2 : Modélisation par homologie des hélices TM 6-7-8 de CopA d'après la structure de l'ATPase à calcium (d'après (Mandal et coll. 2004))

La numérotation des acides aminés de cette figure correspond à celle de CopA d'*A. fulgidus* : sont repérés les cystéines du motif CPC de TM6, le motif YN de TM7 et le motif MxxxS de TM8

Bien que de telles études n'aient pas été réalisées dans les ATPases humaines ou dans Ccc2, quelques informations vont dans le même sens. Chez la souris, la mutation de la méthionine du motif MxxxS en valine est responsable d'un défaut de localisation d'ATP7B dans les glandes mammaires. L'ATPase reste bloquée dans le réseau trans-golgien et n'approvisionne plus le lait en cuivre. Les souris affectées par cette mutation produisent un lait carencé en cuivre qui est fatal au souriceau (Michalczyk et coll. 2000). Dans ATP7A, la mutation de l'asparagine du motif YN en alanine empêche le changement de localisation normalement induit par le cuivre extracellulaire (Voskoboinik et coll. 2003). Chez l'homme plusieurs mutations de malade sont dues à des mutations de ce motif (<http://www.medicalgenetics.med.ualberta.ca/wilson/index.php>). L'ensemble des données disponibles pointent donc l'importance de ce motif pour la fonctionnalité et le trafic des ATPases cuivre. Cependant, l'arrêt du trafic chez ces mutants est vraisemblablement la conséquence de l'inhibition de la phosphorylation auto-catalytique. De plus la modélisation tridimensionnelle du faisceau d'hélice de CopA laisse penser que ces acides aminés seraient impliqués dans la

coordination intra-membranaire du cuivre (Mandal et coll. 2004). Cette hypothèse fait de ces acides aminés des ligands de la voie de passage du cuivre, plutôt que des senseurs du cuivre qui déclencheraient le trafic.

Un autre site à cuivre a été suggéré par Lutsenko et coll. (2007) au niveau des hélices TM1 et TM2 des ATPases humaines. L'analyse des séquences de nombreuses ATPases à cuivre, montrent que ces hélices et cette boucle contiennent un cluster de cystéines, de méthionines et d'histidines (figure D.1.3).

Les auteurs suggèrent que ces acides aminés formeraient un senseur de la quantité de cuivre présent dans la lumière du réseau trans-golgien. Ils seraient donc responsables du changement de localisation de l'ATPase induit par le cuivre. Bien que les positions exactes des cystéines, des méthionines et des histidines ne soient pas strictement conservées entre les différentes ATPases à cuivre, la présence d'un cluster de ces acides aminés dans la plupart d'entre elles rend possible un rôle de cette région dans la fonction ou le trafic de ces ATPases.

ATP7A	: R R - S	F L V S L F F	C	I P V	M	G L	M T Y - -	M M V	M	D H	: 676
Musmus1	: K K - S	F L C S L V F	G I P V	M	G L	M V Y - -	M L I	P S -			: 677
Ratnor1	: K K - S	F L C S L V F	G I P V	M	G L	M I Y - -	M L I	P S -			: 668
ATP7B	: K K - S	F L C S L V F	G I P V	M	A L	M I Y - -	M L I	P S -			: 675
CCC2SC	: K K N S -	I K S T L L A I I	C	M	L L Y	M I V P	M M W	P T -			: 281
ATP7A	: H F A T L	H H N Q N	M	S K E E	M	I N L	H S S	M F L E R Q I			: 705
Musmus1	: - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	-	S T P	Q E T	M V L D H N I			: 690
Ratnor1	: - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	-	S K P	H E T	M V L D H N I			: 681
ATP7B	: - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	-	N E P	H Q S	M V L D H N I			: 688
CCC2SC	: - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	I	V Q D	R I F P Y K E T S F				: 295
ATP7A	: L P G L S V	M N	L L S F L L	C	V P V Q F F G G W Y F Y I Q						: 734
Musmus1	: I P G L S V L N	L I F F I L	C	T F V Q F L G G W Y F Y V Q							: 719
Ratnor1	: I P G L S V L N	L I F F I L	C	T F V Q F L G G W Y F Y V Q							: 710
ATP7B	: I P G L S I L N	L I F F I L	C	T F V Q L L G G W Y F Y V Q							: 717
CCC2SC	: V R G L F Y R D	I L G V I L A	S Y I Q F S V G F Y F Y K A								: 324

Figure D.1.3 : Alignement des TM 1 et 2 d'ATP7A humain, de souris (musmus1) et de rat (ratnor1), ATP7B humain et de Ccc2

Alignement réalisé par le Dr Catty (LCBM ; CEA Grenoble) à partir de 104 séquences d'ATPase de type P1. Les segments TM sont surlignés en jaune, les cystéines en bleu, les méthionines en rouge et les histidines en vert.

Enfin, les résultats de la deuxième partie de mes travaux de thèse suggèrent un autre site à cuivre. Il s'agit du domaine nucléotidique de la grande boucle (GBN) de Ccc2. En effet, les séquences de la GBN de Ccc2, ATP7B et ATP7A contiennent 5 cystéines pour environ 150 acides aminés, ce qui en fait des domaines riches en cystéines. Je montre dans le chapitre

suivant que la GBN de Ccc2 isolée est capable de lier spécifiquement 2 cuivres *in vitro*. *In vivo*, les mutants de Ccc2-C660S ; C680S ; C685S ; C708S et C718S sont capables de compléter une souche *ccc2Δ* dans un milieu carencé en fer et en cuivre. Aucune de ces cystéines prise isolément n'est donc indispensable au fonctionnement de l'ATPase. Cependant peut-être que la mutation simultanée de plusieurs d'entre elles aurait un effet délétère sur la fonction de Ccc2 ou sur son trafic.

Hormis la possibilité pour Ccc2 d'être elle-même sensible au cuivre via un site de fixation qui provoquerait le changement de localisation, une autre possibilité doit être envisagée. En effet, la régulation de nombreuses protéines est sous le contrôle de la phosphorylation par des kinases. Les kinases forment dans la cellule de véritables voies de signalisation, orchestrant la communication intracellulaire. Or il a été mis en évidence qu'ATP7B était phosphorylée par des kinases (Vanderwerf et coll. 2001). Ces auteurs ont montré qu'ATP7B était hyperphosphorylée (phosphorylation non catalytique) lorsque la concentration en cuivre dans le milieu extracellulaire était élevée et que cette phosphorylation était corrélée à la localisation d'ATP7B. Ainsi, ATP7B est hyperphosphorylée dans les vésicules adjacentes à la membrane plasmique et elle ne l'est pas dans le réseau trans-golgien.

En 2008, Valverde et coll. ont mis en évidence *in vitro* une régulation de l'activité catalytique de Ccc2 par la PKA, la protéine kinase dépendante de l'AMPc. Les auteurs ont montré que cette phosphorylation régulatrice dépendait de la présence de cuivre dans le milieu et qu'un site potentiel est la sérine 258. Nous savons que la phosphorylation auto-catalytique de Ccc2 est importante pour son trafic intracellulaire et que lorsque Ccc2 est quasi constitutivement phosphorylée comme dans le mutant TGE-AAA, elle est localisée dans des vésicules comme en présence de forte concentration de cuivre extracellulaire. Le motif activant le déplacement de Ccc2 n'est donc peut-être pas un motif de fixation du cuivre, mais un motif de phosphorylation par des kinases.

1.3.5. Quel rôle pour Ccc2 à la membrane de la vacuole ?

Chez *S. cerevisiae*, Ccc2 n'a qu'un seul rôle connu, celui de délivrer le cuivre aux enzymes de la voie sécrétoire et plus particulièrement à l'oxydase de la membrane plasmique Fet3. Sa localisation dans les différents compartiments cellulaires de cette voie est cohérente avec ce rôle. Fet3 possède un homologue à la membrane de la vacuole, l'oxydase à cuivre Fet5 qui à l'image de Fet3, s'associe avec Fth1 pour permettre le transport du fer de la

vacuole vers le cytoplasme. Il est probable que Ccc2 délivre également à Fet5 le cuivre nécessaire à sa fonction, ce qui donnerait un rôle à la localisation de Ccc2 à la membrane de la vacuole. Cependant bien que Ccc2 délivre du cuivre à Fet3, Ccc2 n'est jamais localisée à la membrane plasmique, même lorsque la voie endocytaire est bloquée comme dans le mutant *end3Δ* (Résultats §1.1.4). Si Ccc2 n'avait pour rôle que de fournir du cuivre aux enzymes de la voie sécrétoire, alors elle pourrait cycliser entre les endosomes tardifs et l'appareil de Golgi sans jamais atteindre la membrane de la vacuole. Il est donc envisageable que Ccc2 possède un rôle spécifique à la membrane de la vacuole. En faveur de cette hypothèse, nous pouvons signaler le fait qu'aucun transporteur spécifique du cuivre n'a été identifié comme responsable du stockage du cuivre dans la vacuole (Catty et coll. 1997 ; Decottignies et Goffeau 1997)

La comparaison avec les rôles d'ATPases à cuivre d'autres organismes nous montre que ces dernières peuvent être spécialisée dans l'efflux du cuivre hors de la cellule (ATPases bactérienne, ATPase CRP1 de *C. albicans*) ou dans l'approvisionnement en cuivre de la voie sécrétoire (ATPase Ccc2 de *C. albicans*). Chez les mammifères, ATP7A et ATP7B remplissent les deux rôles. La balance entre les deux se fait alors par la régulation de leur localisation intracellulaire. En condition basale, elles résident dans le réseau trans-golgien pour approvisionner en cuivre les enzymes du compartiment et lorsque la concentration en cuivre devient trop élevée elles migrent dans des vésicules proches de la membrane plasmique et participent à l'efflux du cuivre de la cellule.

Contrairement à la levure *C. albicans* qui possède deux ATPases à cuivre, une pour la détoxification du cuivre caCrp1 et une autre pour l'approvisionnement de la voie sécrétoire, *S. cerevisiae* ne possède qu'une ATPase à cuivre. En effet, il a été démontré que PCA1, initialement annotée comme une ATPase à cuivre, ne transporte pas de cuivre, mais du cadmium et que la résistance au cuivre induite par son expression n'est due qu'à la capacité de son N-terminal de chélater le cuivre. Ccc2 n'est jamais détectée à la membrane plasmique contrairement à caCRP1, ni dans des vésicules adjacentes à la membrane plasmique tel qu'observé pour ATP7B. Afin de confirmer que Ccc2 n'a aucun rôle de pompe d'efflux, et de mettre en évidence son rôle dans le stockage du cuivre, nous avons réalisé des dosages de cuivre sur cellule entière à des concentrations croissantes de cuivre (Résultats §1.2.1.1). L'inactivation de *CCC2* entraînant une diminution de la quantité de cuivre dans la cellule, il apparaît clairement que Ccc2 participe au stockage du cuivre et non à son efflux. L'inactivation de *CTR2*, le transporteur d'efflux du cuivre de la vacuole accroît la quantité de

cuivre dans la cellule et l'inactivation de *CTR2* et de *CCC2* permet de retrouver des quantités de cuivre dans la cellule comparables à celles où seul *CCC2* est inactivé. Ce résultat et celui des dosages de cuivre de vacuoles isolées (Résultats §1.2.1.2) montrent clairement que la vacuole est le compartiment de stockage du cuivre transporté par Ccc2. Cependant en fonction des concentrations en cuivre, le cuivre n'est pas directement pompé dans la vacuole par Ccc2. En effet si à 300 μM de cuivre, Ccc2 est toujours clairement localisée à la membrane de la vacuole, ce n'est plus le cas à 500 μM de cuivre, où elle a entièrement disparu de la membrane de la vacuole. Pourtant dans les deux cas, les différentes souches présentent un profil identique dans leur quantité de cuivre intracellulaire.

Ce comportement de Ccc2 qui ne pompe pas directement dans le compartiment final de stockage est étonnant. Cependant, nous pouvons le rapprocher de celui d'ATP7B qui contrairement à ATP7A, n'est jamais localisée à la membrane plasmique, mais transporte le cuivre dans des vésicules d'exocytose. Ce comportement peut également être rapproché d'une différence entre les mécanismes de détoxification du cuivre et du fer. Les études transcriptomiques de la résistance au cuivre et au fer pointent le rôle important de la vacuole qui permet d'isoler et de séquestrer les ions libres du reste de la cellule. Mais Jo et coll. (2008) ont mis en évidence que le stress cuivrique contrairement au stress ferrique activait aussi de nombreux gènes impliqués dans l'organisation, la biogénèse et le transport des endosomes (Jo et coll. 2008). Dans la suite de leur étude, ils observent l'effet de l'inactivation de ces gènes et montrent leur importance pour la résistance au cuivre de la cellule, alors qu'ils ne sont pas essentiels pour la croissance des levures en présence de concentrations toxiques de fer.

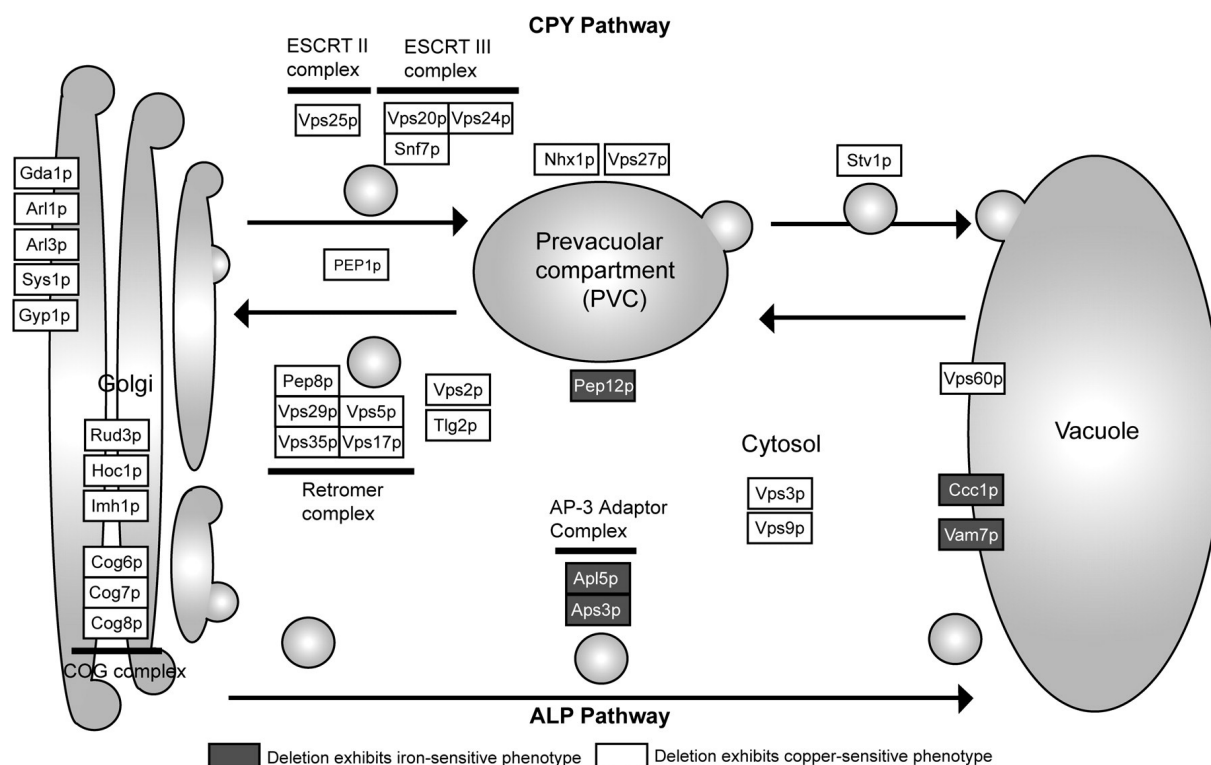


Figure D.1.4 : Représentation schématique de la voie de transport entre l'appareil de Golgi et la vacuole. Les gènes de ces voies dont l'inactivation entraîne une augmentation de la sensibilité au fer sont représentés dans des cases grisées et ceux augmentant la sensibilité au cuivre dans des cases blanches (d'après (Jo et coll. 2008))

Ces résultats sont retrouvés dans la récente étude du transcriptome et du délétome de levure soumis à différents stress métallique de Jin et coll. 2008. Les différentes études transcriptomiques ne font pas ressortir de forte activation de la transcription de *Ccc2* lorsque la cellule est soumise à des concentrations en cuivre toxiques (Table D.1.1).

facteur	milieu	métal	concentration (µM)	souche	référence
2,2	YPD	cuivre	5000	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
3,6	YPD	cuivre	9000	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
1,3	SC	cuivre	8	S288c	Van Bakel et coll. Physiol genomics 2005
1,4	YDP	cuivre	10000	S288c	Yasokawa et coll. 2008
1,3	YDP	argent	10	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
4,3	YDP	arsenic	1250	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
2,1	YDP	cadmium	25	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
2,1	YDP	chrome	1700	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
1,2	YDP	mercure	19	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
2,4	YDP	zinc	1000	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008

Table D.1.1 : Activation de la transcription de *CCC2* par le cuivre
Revue des valeurs d'activation de la transcription de *CCC2* trouvées dans la littérature.

Cette petite augmentation de la transcription n'est pas nécessairement reliée à la participation de *Ccc2* aux mécanismes de protection de la cellule contre le cuivre. En effet, on

constate dans ces études de transcriptomique une augmentation de la transcription des gènes activés par Aft1, le facteur de transcription responsable de la réponse à une carence en fer. Or la transcription de *Ccc2* est connue pour être sous le contrôle d'Aft1. En réponse à un excès de métaux moins autres que le fer dans le milieu de culture, la levure active ses voies de réponse à une carence en fer.

facteur	milieu	métal	concentration (µM)	souche	référence
2,8	SC	cuivre	8	S288c	Van Bakel et coll. Physiol genomics 2005
3,7	SC	cuivre	100	CM66J	Gross et coll. JBC 2000
4,3	YDP	cuivre	5000	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
3,9	YDP	argent	10	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
1,66	YDP	arsenic	1250	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
2,3	YDP	cadmium	25	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
1,77	YDP	chrome	1700	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
2,2	YDP	mercure	19	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008
4,4	YDP	zinc	1000	BY4743	Jin et coll. PLOS genetics 2008

Table D.1.2 : Activation de la transcription de *FET3* par divers métaux

Revue des valeurs d'activation de la transcription de l'oxydase à cuivre *FET3* du complexe d'import de fer à haute affinité. Exemple d'activation d'un gène marqueur de la voie de réponse à une carence en fer.

Cette carence serait induite par une compétition pour l'entrée dans la cellule des différents métaux. Li et Kaplan (1998) montrent que l'application de différents stress métalliques n'affectent pas la quantité de fer intracellulaire d'une souche de levure sauvage. Par contre, le fer devient quasiment indétectable lors de l'application des mêmes stress dans une souche de levure dont le transporteur de fer à haute affinité est inactivé par l'inactivation de *FET3*. Cette carence peut être corrigée par l'ajout de fer dans le milieu de culture, accréditant l'hypothèse d'un problème de compétition pour l'entrée des métaux dans la cellule, lorsque la concentration de l'un d'entre eux devient excédentaire. Le fer est un élément indispensable à la vie cellulaire et sa concentration est finement régulée car toute variation de cette concentration a des conséquences dramatiques pour la cellule. Il ressort également de ces études de transcriptomique que la transcription de *CCC2* est activée d'un facteur plus ou moins égal à 2 par l'application de différents stress métalliques (Table D1.1). L'augmentation de la transcription de *CCC2* n'est donc pas un effet spécifique du cuivre, mais bien une réponse à la carence en fer induite par ces divers stress (Jin et coll. 2008).

L'activité de transport du cuivre dans la vacuole n'est donc probablement pas un élément majeur de la stratégie de détoxification du cuivre par *S. cerevisiae*. Cette conclusion est renforcée par l'effet de l'inactivation de *CCC2* sur la croissance de la levure à des concentrations toxiques de cuivre. En effet dans nos conditions expérimentales l'inactivation

de CCC2 favorise la résistance de la levure au cuivre (Résultats §1.2.2.1). L'hypothèse que nous proposons dans les résultats se fonde sur l'idée que la prise en charge du cuivre et de ses effets serait plus rapide et donc plus efficace dans une cellule qui ne serait plus en mesure de stocker le cuivre dans un compartiment intracellulaire. Cette hypothèse pourrait être renforcée par une mesure de la transcription des gènes responsables de la détoxification du cuivre et de ses effets induits tels que les gènes des métallothionéines Cup1 et Crs5 ou de la Super Oxyde Dismutase.

En conclusion si Ccc2 est bien localisée à la membrane de la vacuole et possède un rôle dans le stockage du cuivre dans la cellule, aucune des données en notre possession à ce jour nous permet d'envisager que Ccc2 possède de rôle direct dans la détoxification du cuivre qui reste principalement l'apanage des métallothionéines chez *S. cerevisiae*.

2. En route vers le site de transport intra-membranaire.

Au cours de sa thèse, Isabelle Morin a montré que dans une souche de levure où les gènes de Ccc2 et Atx1 ont été inactivés, Atx1 et Ccc2 doivent être co-exprimés pour restaurer le transfert du cuivre à la voie sécrétoire si le milieu est appauvri en cuivre et en fer (Morin 2005). En utilisant ce test, elle montre qu'Atx1 est incapable de transférer le cuivre à une protéine Ccc2 tronquée de ses MBD. Elle démontre ainsi *in vivo* le transfert du cuivre entre Atx1 et les MBD de Ccc2. Elle montre également que les MBD exprimés en trans sous forme soluble à la place d'Atx1 sont eux capables de transférer le cuivre à cette protéine tronquée de ses MBD. Il est ainsi clair qu'Atx1 transfère le cuivre aux MBD qui le transfèrent au reste de la protéine. Il se pose alors la question de savoir si les MBD transfèrent directement le cuivre au site de transport ou s'il existe une étape intermédiaire entre les deux sites. Dans ce chapitre nous étudierons l'hypothèse d'un transfert du cuivre par un site intermédiaire avant le site de transport intra-membranaire. En effet l'étude de l'hypothèse d'un transfert direct est encore trop préliminaire pour être présentée ici.

Tsivkovskii et coll. ont montré *in vitro* l'existence d'une interaction entre le domaine nucléotidique de la grande boucle (GBN) d'ATP7B et son domaine N-terminal (Tsivkovskii et coll. 2001). L'interaction entre les deux domaines est plus faible en présence de cuivre qu'en son absence. Les auteurs concluent à l'existence d'une régulation par le domaine N-terminal de l'activité de l'ATPase via cette interaction avec la GBN.

Par ailleurs l'analyse des séquences des régions cytosoliques de Ccc2 ont permis d'identifier un site potentiel de liaison du Cu(I) sur la GBN de Ccc2. Ce site serait composé des cystéines d'un motif C⁶⁸⁰xxxxC⁶⁸⁵ de la GBN combinées à l'histidine du motif conservé H⁶⁷⁰P situé 10 acides aminés en amont des cystéines. Il est intéressant de noter qu'un motif HP/CxxxxC est aussi présent dans la séquence des GBN d'ATP7A et ATP7B (voir alignement des GBN Annexe 3) et que la mutation de l'histidine du motif HP en glutamine est la mutation la plus fréquente chez les patients atteints de la maladie de Wilson.

Ces deux constatations permettent d'envisager un transfert du cuivre des MBD à la GBN. Cette hypothèse est séduisante. Tout d'abord d'un point de vue structural, car elle n'implique pas de grands changements structuraux comme en implique l'hypothèse d'une interaction du site de transport avec les MBD. Ensuite parce que le site à cuivre

précédemment décrit a déjà été mis en évidence dans la protéine ScoI, impliquée dans l'apport de Cu(I) à la cytochrome C oxydase. Dans cette protéine le Cu(I) se lie au niveau d'un motif CxxxC de concert avec une histidine (Balatri et coll. 2003).

Nous avons donc décidé de produire la GBN de Ccc2 sous la forme d'une protéine recombinante pour en étudier *in vitro* la liaison du cuivre. Nous avons défini la séquence du domaine nucléotidique d'après les motifs consensus des ATPases de type P et d'après la structure de la GBN d'ATP7B publiée par l'équipe de S. Lutsenko (Efremov et coll. 2004; Dmitriev et coll. 2006).

2.1. Etude du domaine Nucléotidique de la Grande Boucle de Ccc2.

2.1.1. Production et purification.

La séquence de la GBN a été extraite par PCR et clonée dans le vecteur de surexpression pQE60 (Quiagen). La protéine a été ensuite produite et purifiée tel que décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes (§4.1). Le dosage des cystéines, en condition non dénaturante, détecte 5 cystéines dans la GBN, ce qui correspond au nombre de cystéines présentes dans la protéine, et nous indique que la forme native de la GBN recombinante ne possède ni cystéines oxydées, ni pont disulfure.

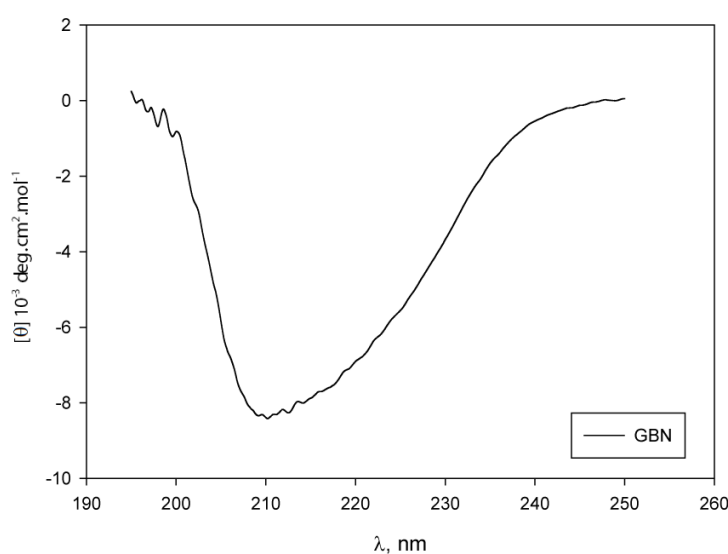


Figure R.2.1 : Spectre de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain de la GBN de Ccc2
GBN 10 μ M; MES-NaOH 50 mM (pH 6); glycérol 1 %; NaCl 40 mM; 5 °C

A l'issue de la purification nous avons vérifié le repliement de la GBN de Ccc2 par dichroïsme circulaire. Ainsi que nous le montre la figure R.2.1, la GBN présente un spectre de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain nous indiquant clairement des structures secondaires. L'utilisation de spectres de référence des différentes structures secondaires connues (Matériels et Méthodes §5.2) nous donne en première approximation une idée du contenu en structure secondaire de la GBN. La présence d'un minimum à 210 nm est la signature d'une structure en hélices α ; cependant l'absence du second minimum à 220 nm, caractéristique des protéines en hélices α nous indique que la GBN ne se structure pas strictement en hélices α . Le second minimum pourrait être masqué par un pic à 215 nm correspondant à un feuillet β anti-parallèle. Une telle structure en hélices α et feuillets β correspond assez bien à la structure de la GBN d'ATP7B obtenue par Dmitriev et coll., composée de 6 brins β anti-parallèles, délimités par des hélices α (Dmitriev et coll. 2006). Le spectre de dichroïsme circulaire nous indique donc que le domaine nucléotidique de Ccc2 est correctement replié et son repliement est proche de celui du domaine équivalent d'ATP7B.

2.1.2. Etude de la fixation du cuivre sur la GBN

Nous avons étudié la liaison du cuivre sur la GBN en suivant l'apparition d'une bande de transfert de charge à 260 nm, caractéristique d'une interaction entre le Cu(I) et les groupements thiolates.

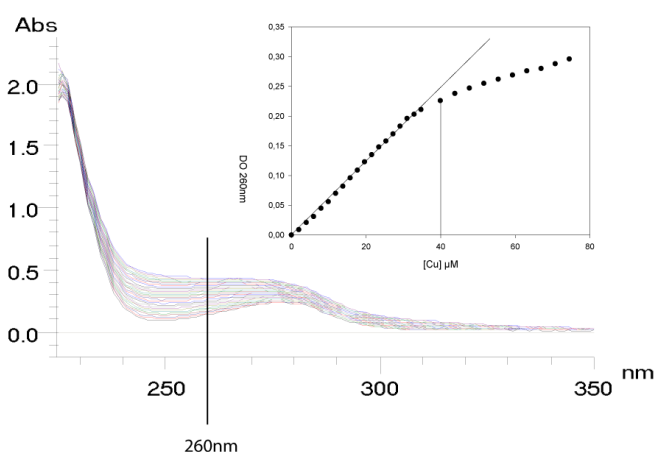


Figure R.2.2 : Spectre d'absorption de la GBN en présence de concentration croissante de Cu(I)
 GBN 20 μM; EPPS-NaOH 50 mM (pH 8.5); NaCl 400 mM; Na₂SO₃ 1 mM; 2 °C
 En encadré : Suivi de l'absorbance à 260 nm en présence de concentrations croissantes de cuivre.

L'évolution de l'absorbance à 260 nm de la GBN en présence de cuivre est biphasique, une rupture de pente franche marquant le passage d'une phase à l'autre de la courbe. L'affinité du cuivre pour la liaison peptidique est connue, elle est à la base de méthodes de dosage des protéines comme le micro-BCA de chez Pierce. Le cuivre a donc tendance à se coller aux protéines de manière non spécifique, ce qui se traduit par cette augmentation constante de l'absorbance à 260 nm. Si ce seul phénomène était observé avec la GBN, nous verrions une augmentation constante de l'absorbance jusqu'à ce que le cuivre ait saturé toutes les liaisons. Le caractère biphasique de la courbe nous indique que nous observons deux phénomènes distincts, le premier pouvant être attribué à une fixation du cuivre dans des sites spécifiques de la GBN, le second à la fixation du cuivre sur la liaison peptidique.

La titration de la GBN par le cuivre met donc en évidence la liaison spécifique de 2 cuivres par la GBN. Ce résultat est inattendu, car nous n'avions identifié qu'un seul site de liaison du Cu(I). La GBN de Ccc2 contient 3 autres cystéines en plus des deux déjà proposées et il est possible que son repliement fasse apparaître un nouveau site de fixation du cuivre entre des cystéines éloignées dans la structure primaire.

L'affinité de la GBN pour le cuivre a été étudiée en réalisant une expérience de compétition pour le Cu(I) entre la GBN et le BCS, un chélateur du Cu(I) ayant une affinité élevée pour ce dernier (constante d'association du complexe $\text{Cu}(\text{BCS})_2$ entre 10^{18} et 10^{22} (Xiao et coll. 2004; Miras et coll. 2008)). L'espèce $\text{Cu}(\text{BCS})_2$ présente une bande d'absorption spécifique à 485 nm que nous avons suivie après des ajouts successifs de BCS à une solution dans laquelle l'espèce GBNCu_2 était déjà formée. L'analyse des spectres de cette expérience, confrontée à l'analyse de la titration de la GBN par le Cu(I) (figure R.2.2) nous ont permis d'évaluer la constante d'association du complexe GBNCu_2 en utilisant le logiciel Specfit. Nous avons obtenu une constante d'association de 10^9 pour le complexe GBNCu_2 . La déconvolution de ces spectres montre également que la liaison de chaque cuivre n'est pas accessible isolément. Les deux sites sont coopératifs ou bien d'affinités identiques.

2.1.1.3. Etude structurale de la liaison du cuivre sur la GBN.

A partir des résultats obtenus en spectroscopie d'absorption, nous avons cherché à savoir si la fixation du cuivre sur la GBN entraînait des réarrangements structuraux. Nous avons profité pour cette étude du signal de dichroïsme circulaire de la GBN.

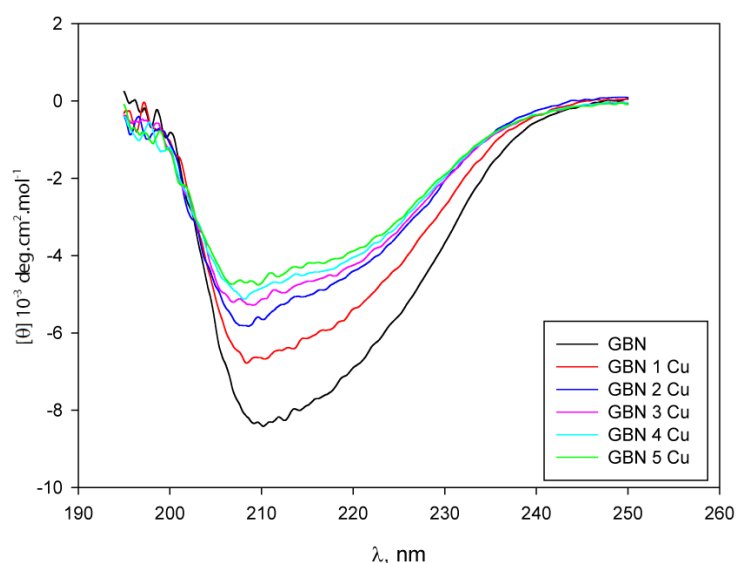


Figure R.2.3 : Spectre de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain de la GBN en présence de concentrations croissantes de cuivre exprimées en équivalent de la GBN.
GBN 15 μ M; MES-NaOH 50 mM (pH 6); glycérol 1 %; NaCl 40 mM; cuivre ajouté sous forme $\text{CuSO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_3$

La liaison du cuivre entraîne une nette modification de la forme et de l'intensité du spectre de la GBN. Ces modifications ont principalement lieu entre 0 et 2 équivalents de cuivre. A partir de 2 équivalents les spectres sont semblables, seule leur intensité varie. Enfin au-delà de 4 équivalents, nous n'observons plus de modification significative du spectre lorsque la concentration en cuivre augmente.

Ces variations de forme et d'intensité du spectre CD en présence de cuivre dans le milieu sont fortement corrélées aux résultats de spectroscopie d'absorption. En outre, nous avons vérifié que dans nos conditions, l'ajout de cuivre sur le lysosyme, une protéine sans affinité particulière pour le cuivre, n'a pas d'effet sur le signal de dichroïsme. Le phénomène observé avec la GBN est donc bien dû à une affinité spécifique pour le cuivre et confirme les résultats précédents.

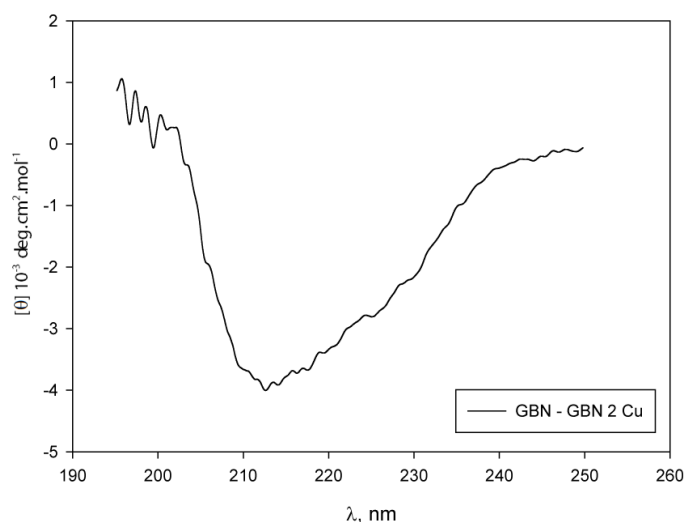


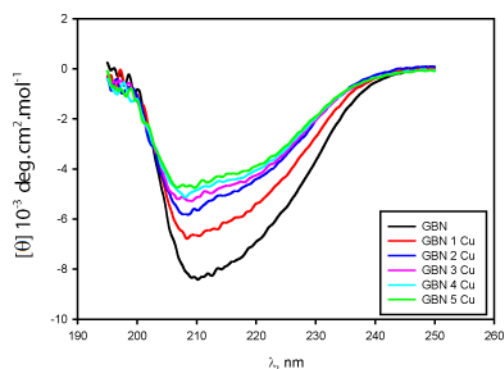
Figure R.2.4 : Différence entre les spectres de dichroïsme circulaire des formes apo et holo
(spectre GBNCu_2 – spectre GBN de la figure précédente)

La fixation du cuivre entraîne une évolution du spectre de la protéine que nous pouvons interpréter comme un réarrangement de la structure de la GBN. Nous observons sur le spectre de l'holoprotéine l'apparition d'un épaulement à 220 nm qui pourrait indiquer un renforcement de la contribution des hélices α dans la composition en structure secondaire de la protéine. Cette interprétation est renforcée par l'analyse du spectre de différence entre celui de la forme apo et celui de la forme holo, dont la forme est caractéristique de structures en feuillets β (figure R.2.4). La fixation du cuivre sur la GBN pourrait donc entraîner une diminution de la contribution des feuillets β dans la structure de la GBN, ou une augmentation de celle des hélices α , ou encore une combinaison des deux.

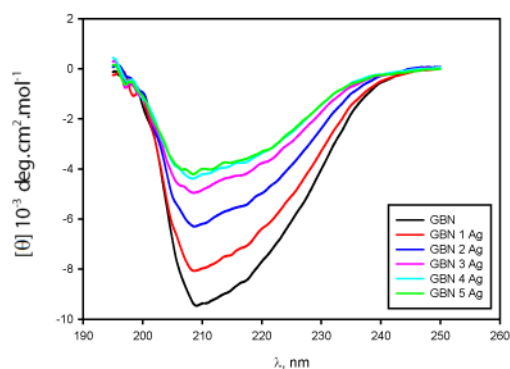
2.1.4. Spécificité de l'affinité de la GBN pour les métaux.

La spécificité des sites à métaux dans les protéines est rarement stricte *in vitro*. Ainsi le domaine N-terminal d'ATP7B présente une certaine affinité pour différents métaux avec dans l'ordre d'affinité : $\text{Cu(I)} \gg \text{Zn(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Co(II)}$ (DiDonato et coll. 1999). La structure d'une protéine comme Atx1 a d'abord été résolue en présence d'argent, puis de mercure (Gitschier et coll. 1998; Rosenzweig et coll. 1999). Nous avons donc choisi de tester la liaison de différents métaux sur la GBN afin de déterminer la spécificité des sites découverts. Pour ce faire nous avons supposé que les différents métaux pourraient en se fixant aux sites à cuivre déjà observés provoquer également un réarrangement structural de la GBN. Nous pouvons constater que la réponse de la GBN varie en fonction du métal. Le zinc et le

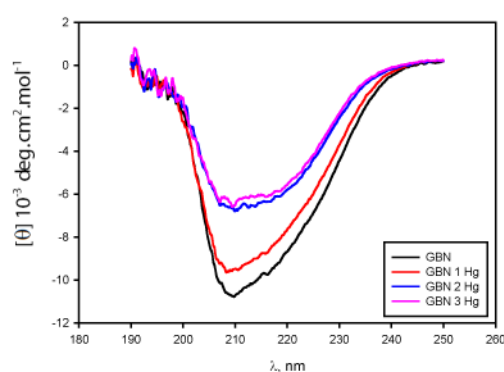
nickel qui encadrent le cuivre dans la ligne du tableau périodique n'entraînent pas de changement de conformation de la GBN. Il est donc probable que la GBN n'a pas d'affinité pour ces métaux. La fixation de l'argent qui est juste en dessous du cuivre dans le tableau périodique et possède donc des propriétés atomiques très similaires à celles du cuivre a un effet identique à celui du cuivre. Le mercure modifie également le spectre de la protéine entre 0 et 2 équivalents; au-dessus de 2 équivalents, le spectre est plus stable que ce que nous observons dans le cas du cuivre et de l'argent. La fixation spécifique d'Ag(I) et de Hg(II) par la GBN confirme l'existence de sites susceptibles de fixer le Cu(I) *in vivo*. Le cas du cadmium est différent, il entraîne une diminution constante de l'intensité du signal de façon non spécifique.



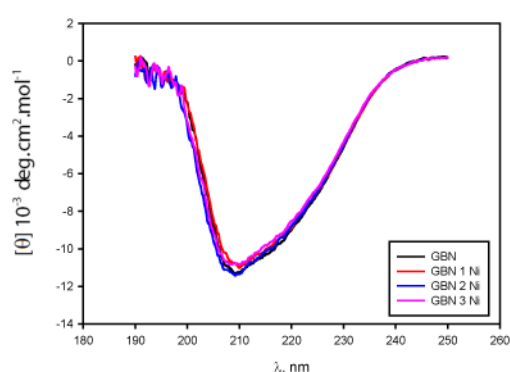
GBN + Cuivre



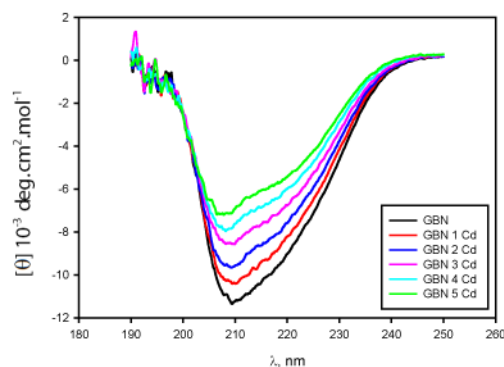
GBN + Argent



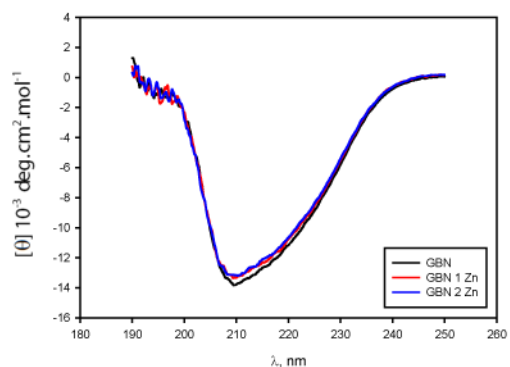
GBN + Mercure



GBN + Nickel



GBN + Cadmium



GBN + Zinc

Figure R.2.5 : Spectres de dichroïsme circulaire de la GBN en présence de différents métaux
 GBN 15 μ M; MES-NaOH 50 mM (pH 6); glycérol 1 %; NaCl 40 mM; cuivre ajouté sous forme $\text{CuSO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_3$;
 autres métaux ajoutés sous forme AgNO_3 ; HgCl_2 ; NiSO_4 ; CdCl_2 ; ZnSO_4 .

2.2. Etude du motif ⁶⁷⁰HP/⁶⁸⁰CxxxxC

L'étude de ce motif a été réalisée par mutagenèse dirigée en remplaçant successivement ou simultanément les cystéines par des sérines et en remplaçant l'histidine du motif HP par une phénylalanine dont la structure permet de perturber *a minima* la structure de la GBN.

2.2.1. Production et purification

Nous avons dans un premier temps réalisé par mutagenèse dirigée un double mutant sérine du motif CxxxxC pour construire le mutant GBNss. Malgré nos efforts, ce mutant a été difficile à produire et purifier et les rendements sont restés très faibles (0.43 mg par litre de culture, soit 25 fois moins que la GNB)

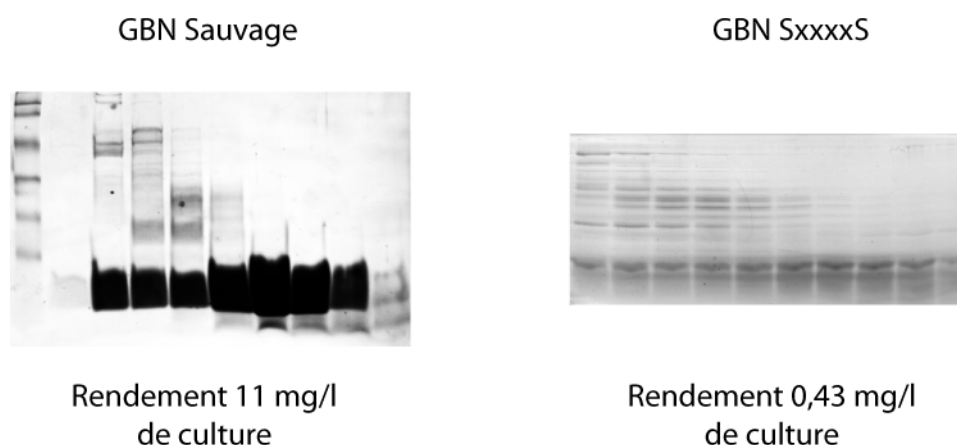


Figure R.2.6 Quantités de protéine recueillies après la colonne de gel filtration lors de la purification

Nous avons également construit les mutants C680S, C685S et H670F. La production et la purification des mutants C685S et H670F n'ont pas posé de problèmes, mais nous avons été dans l'incapacité de surproduire et donc de purifier le mutant C680S. Il apparaît donc que cette cystéine serait importante pour la stabilité de la GBN lors de la production dans *E. coli*, il sera intéressant d'évaluer l'impact de cette mutation dans la levure.

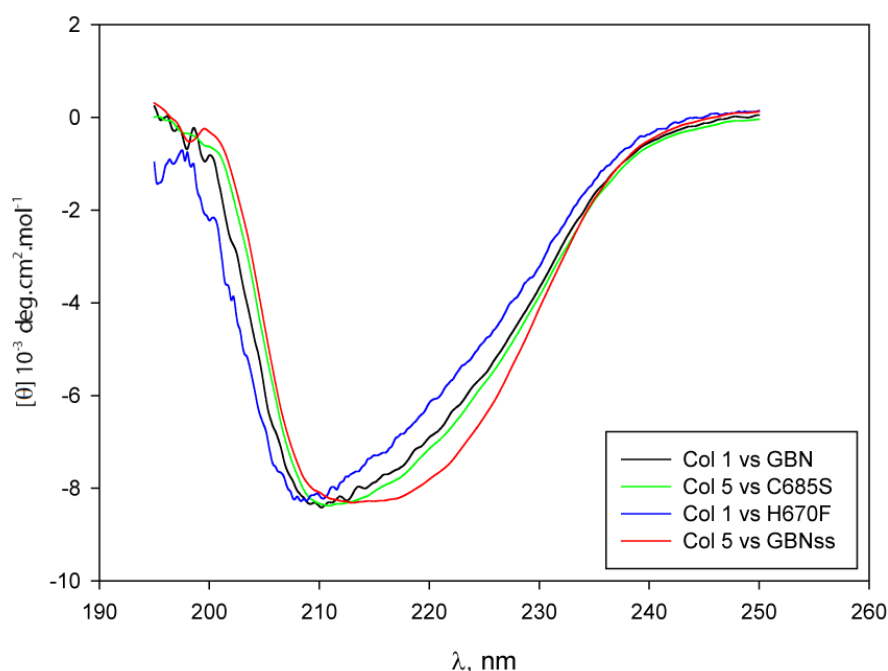


Figure R.2.7 : Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire des mutants du motif $^{670}\text{HP}/^{680}\text{CxxxxC}$ de la GBN

GBN ; C685S ; H670F 15 μM ; GBNss 10 μM ; MES-NaOH 50 mM (pH 6); glycérol 1 %; NaCl 40 mM; cuivre ajouté sous forme $\text{CuSO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_3$

L'analyse des spectres de dichroïsme circulaire des différents mutants montre que les spectres des mutants C685S et H670F sont similaires à la GBN sauvage, indiquant que ces mutations n'affectent pas le repliement de la protéine. Le spectre du double mutant sérine du motif CxxxxC est nettement plus aplati entre 210 et 220 nm nous indiquant que la double mutation affecte le repliement normal de la protéine (figure R.2.7).

2.2.2. Etude de la fixation du cuivre sur les mutants de la GBN.

De la même façon que nous avons suivi la fixation du cuivre sur la GBN sauvage, nous avons étudié la fixation du cuivre sur ces mutants (figure R.2.8).

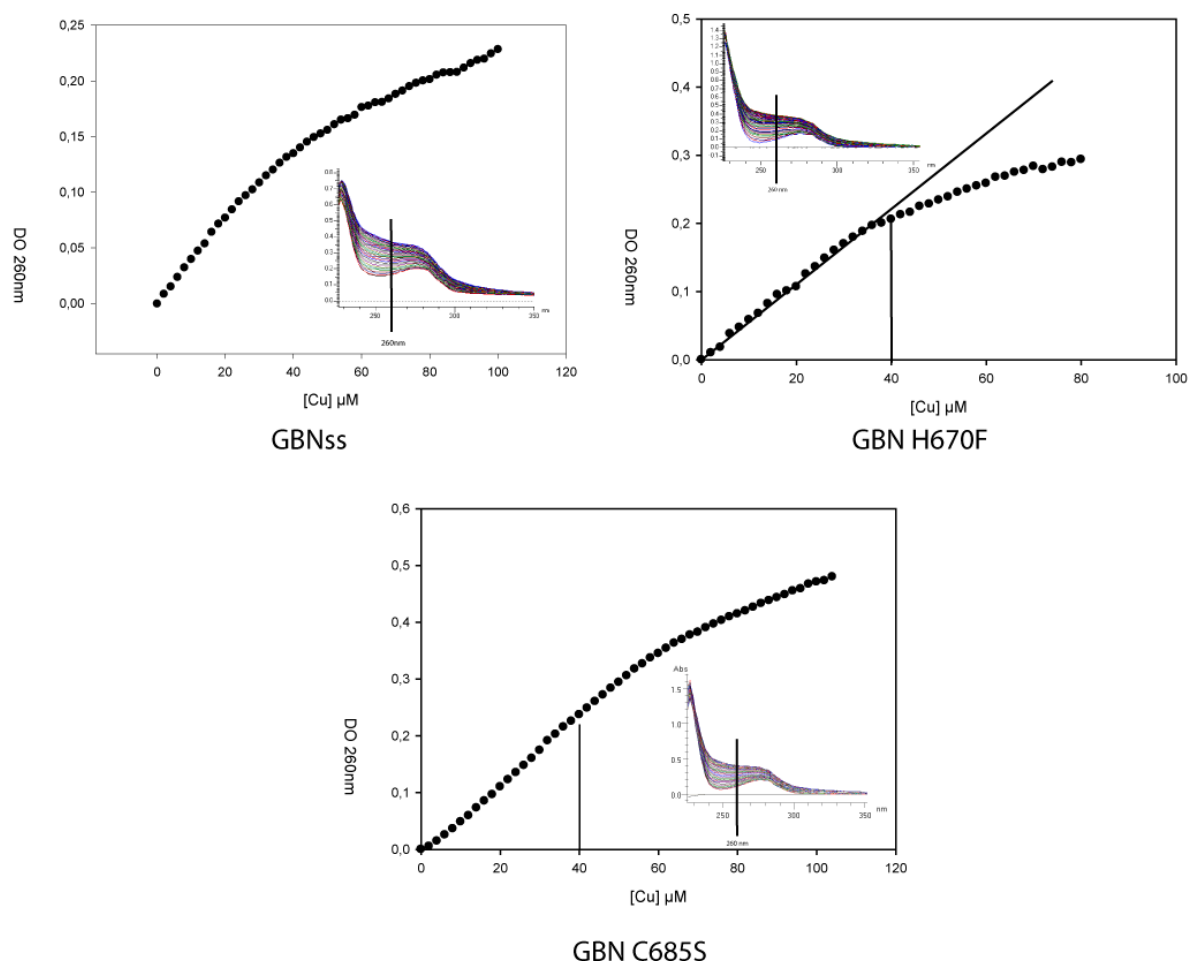


Figure R.2.8 : Suivi de l'absorbance à 260 nm en présence de concentrations croissantes de cuivre.
 GBNss 10 μM; GBN-C685S ou -H670F 20 μM; EPPS-NaOH 50 mM (pH 8.5); NaCl 400 mM; Na₂SO₃ 1 mM;
 5 °C

En encadré : Spectre d'absorption des mutants de la GBN en présence de concentrations croissantes de Cu(I)

Du fait de son faible rendement de purification, les expériences sur la GBNss ont été réalisées à une concentration en protéine de 10 μM au lieu de 20 μM pour les autres protéines. Le mutant GBN-H670F présente une courbe biphasique identique à celle de la GBN avec une rupture de pente à 2 équivalents de Cu(I) par protéine. Cependant cette rupture est moins franche que celle observée pour la GBN sauvage, ce qui pourrait indiquer que ce mutant fixe le cuivre avec une affinité moindre que dans le cas de la GBN sauvage. Le mutant GBNss présente une courbe sans rupture de pente apparente qui nous laisse supposer que la fixation du cuivre sur ce mutant est uniquement due à une fixation non spécifique. Le mutant C685S a un comportement atypique. En effet contrairement au mutant GBNss, la courbe de titration de C685S présente une rupture de pente à vers 60 μM de cuivre par GBN au lieu des 40 μM observés pour la GBN sauvage. Ce résultat pourrait indiquer que l'affinité du mutant C685S est beaucoup plus faible que celle de la GBN sauvage.

2.2.3. Etude structurale de la liaison du cuivre sur les GBN modifiées.

Les résultats obtenus par spectroscopie d'absorption ont été confirmés par dichroïsme circulaire. De la même façon que pour la GBN, nous avons observé par dichroïsme circulaire, l'effet de la liaison du cuivre sur les GBN modifiées.

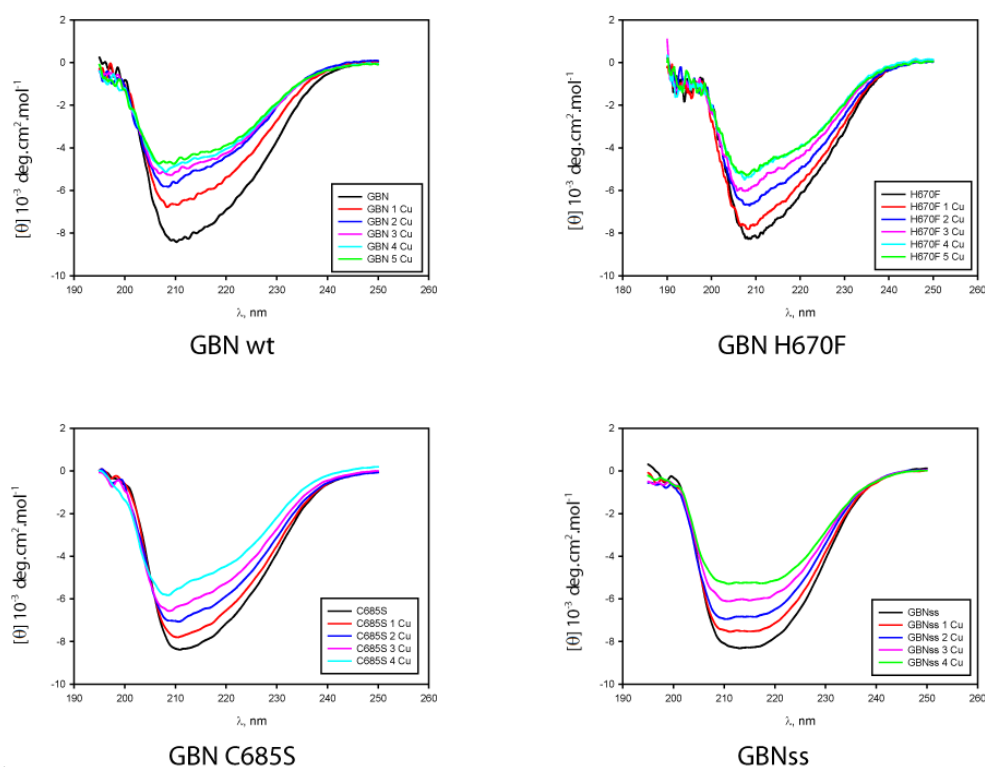


Figure R.2.9: Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain de la GBN et de mutants en présence de concentrations croissantes de cuivre exprimées en équivalent de la protéine présente.

Protéines 15 μ M; MES-NaOH 50 mM (pH 6); glycérol 1 %; NaCl 40 mM; cuivre ajouté sous forme $\text{CuSO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_3$

La réponse des 3 mutants diffère de celle de la GBN. GBN-H670F présente une diminution de l'intensité du spectre du mutant nettement plus marqué entre 3 et 4 équivalents que dans le cas de la protéine sauvage. Cependant comme pour la GBN, le cuivre n'a plus d'effet sur le spectre après 4 équivalents. Ce résultat conforte l'hypothèse d'une plus faible affinité de GBN-H670F pour le cuivre. De plus comme pour la GBN, nous observons nettement l'apparition d'un pic à 210 nm et un épaulement à 220 nm à partir de 3 équivalents de cuivre.

Les intensités des spectres des mutants C685S et GBNss diminuent de façon constante tout au long des ajouts de cuivre, la protéine ayant tendance à précipiter à partir de 5

équivalents nous n'avons pas pu obtenir de données fiables après 4 équivalents de cuivre. Ce comportement ressemble beaucoup à celui observé dans le cas du cadmium sur la GBN sauvage, ce qui permet de penser que le cuivre se lierait de manière non spécifique ou avec une très mauvaise affinité. Cependant alors que le mutant C685S présente à 4 équivalents un spectre très proche de celui de la GBN sauvage à 2 équivalents, le mutant GBNss conserve un spectre dont la forme reste stable au fur et à mesure des ajouts de cuivre. Encore une fois ce résultat corrobore le résultat obtenu en spectroscopie d'absorption.

Le motif HP/CxxxxC que nous avons identifié dans la GBN ne constitue donc pas le motif de fixation du cuivre sur la GBN de Ccc2. L'histidine 670 n'a pas de rôle majeur dans notre étude et les cystéines 680 et 685 ont certainement des rôles structuraux, mais ne sont pas directement responsables de la fixation du cuivre par la protéine.

La grande boucle de Ccc2 comprend 3 autres cystéines en position 660, 708 et 718. La mutation de la position 660 n'ayant pas encore été réalisée, je présenterai dans le paragraphe suivant les résultats obtenus pour les mutants C708S et C718S.

2.3. Etude des cystéines C708S et C718S

La mutagenèse, la production et la purification des mutants GBN-C708S et -C718S n'ont pas posé de difficultés majeures et nous avons dans les deux cas obtenus des quantités suffisantes de protéine pure pour l'étude biochimique.

2.3.1. Etude de la fixation du cuivre sur les mutants de la GBN

De la même façon que nous avons suivi la fixation du cuivre sur la GBN sauvage, nous avons étudié la fixation du cuivre sur ces mutants (figure R.2.10).

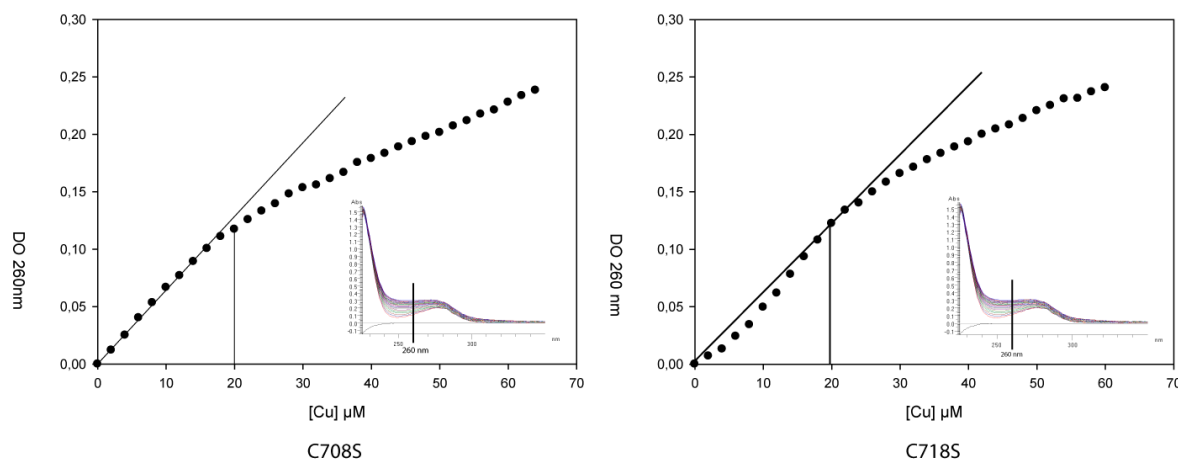


Figure R.2.10 : Suivi de l'absorbance à 260 nm en présence de concentrations croissantes de cuivre.
 GBN-C708S ou -C718S 20 μM; EPPS-NaOH 50 mM (pH 8.5); NaCl 400 mM; Na₂SO₃ 1 mM
En encadré : Spectres d'absorption de mutants de GBN en présence de concentrations croissantes de Cu(I)

L'évolution de la densité optique à 260 nm des mutants GBN-C708S et -C718S est clairement linéaire jusqu'à une concentration en cuivre égale à 1 équivalent de protéine, où nous observons une rupture de pente. Ce résultat nous indique que ces deux mutants lient spécifiquement un cuivre par protéine, contrairement à la GBN qui en lie deux. Nous avons donc identifié deux cystéines susceptibles de participer aux sites à cuivre de la GBN, Cys⁷⁰⁸ et Cys⁷¹⁸. Cependant, il n'est pas possible à ce stade de savoir si elles participent au même site ou si chacune d'elle appartient à un site différent.

2.3.2. Etude structurale de la liaison du cuivre sur les mutants.

Comme précédemment pour la liaison du cuivre sur la GBN, nous avons enregistré les spectres de dichroïsme circulaire des mutants GBN-C708S et -C718S en présence de concentrations croissantes de cuivre (figure R.2.11).

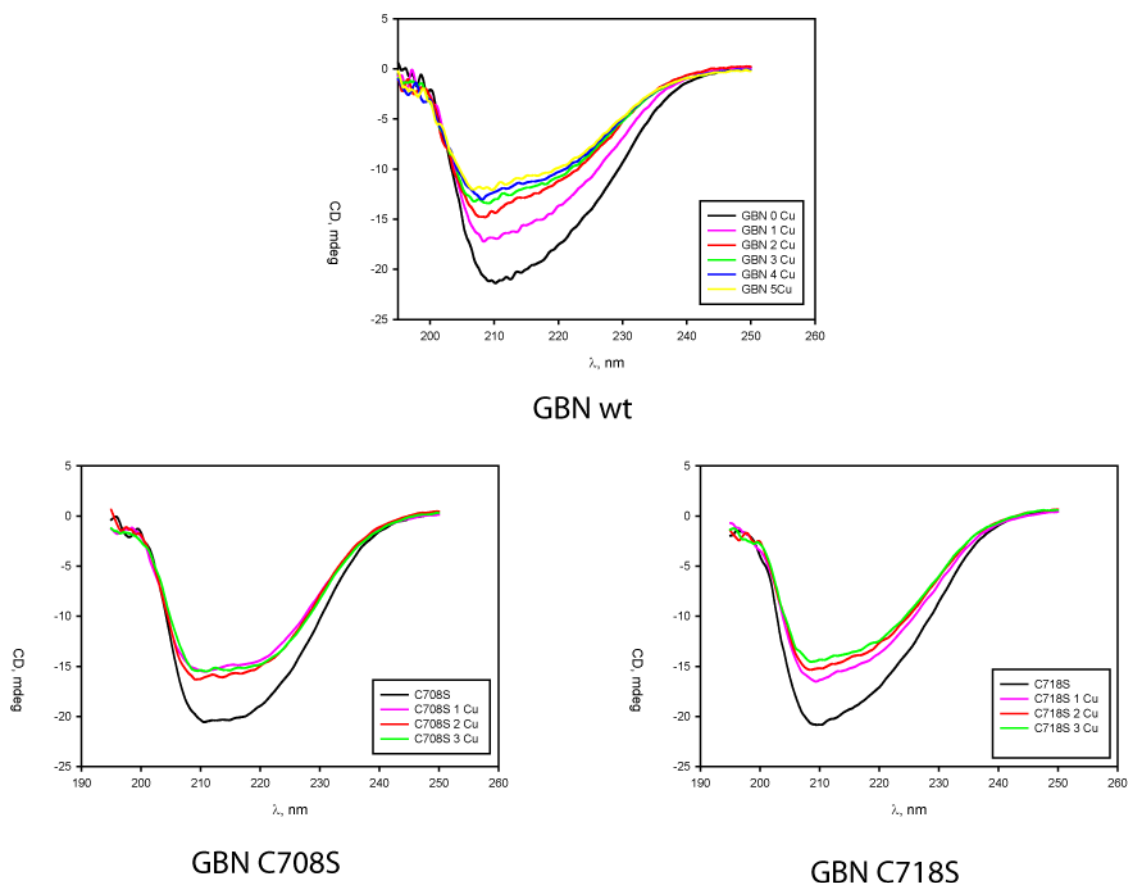


Figure R.2.11: Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain de la GBN et de mutants en présence de concentrations croissantes de cuivre exprimées en équivalent de la protéine présente.

Protéines 15 μ M; MES-NaOH 50 mM (pH 6); glycérol 1 %; NaCl 40 mM; cuivre ajouté sous forme $\text{CuSO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_3$

La première chose que nous observons sur ces spectres est que la GBN-C718S a un repliement global similaire à celui de la GBN, mais que la GBN-C708S a un repliement plutôt proche de celui de la GBNss. Cependant, la diminution de l'intensité du signal dichroïque du mutant C708S cesse à partir d'un équivalent de cuivre par protéine, comme l'absorption à 260 nm. La liaison du cuivre sur la GBN-C708S est donc bien spécifique. Le même phénomène de saturation est observé pour le mutant GBN-C718S. Ce résultat confirme que les mutants GBN-C708S et -C718S fixent un cuivre par protéine.

2.4. Localisation du site de liaison du cuivre sur un modèle de la GBN de Ccc2

Afin de pouvoir analyser les résultats expérimentaux obtenus au niveau structural, nous avons demandé à l'équipe de modélisation moléculaire du laboratoire du Dr Crouzy des

prédictions de structure de la GBN de Ccc2, par homologie avec la structure connue de la grande boucle d'ATP7B (Dmitriev et coll. 2006).

Les modèles par homologie de la GBN ont été réalisés avec le programme MODELLER (Sali et Blundell 1993) à partir de la seule structure connue d'une grande boucle d'ATPase à cuivre, celle d'ATP7B. Les 165 acides aminés A¹⁰³² à D¹¹⁹⁶ de la structure 2ARF de cette ATPase ont été utilisés. Etant donné le petit nombre de protéines homologues à Ccc2 de structure connue (1 seule) et l'homologie relativement faible de Ccc2 avec cette protéine, nous avons réalisé plusieurs alignements différents des séquences primaires d'ATPases à métaux mous pour évaluer l'influence de la qualité de l'alignement sur les modèles obtenus. Nous donnons en annexe 4 les alignements Ccc2_hum et Ccc2_cluster réalisés à partir des seules ATPases humaines pour le premier et augmenté d'une ATPase à cadmium et d'une ATPase à cuivre d'archaea (CopA d'*A. fulgidus*) pour le second. A partir de chacun de ces alignements Ccc2_hum et Ccc2_cluster et de la structure 2ARF, le programme MODELLER a construit 10 modèles des 140 acides aminés D⁶²⁷ à K⁷⁶⁶ de Ccc2. Nous avons conservé le modèle ayant la meilleure énergie (objective function) dans MODELLER pour les analyses de mécanique moléculaire.

Nous avons utilisé le logiciel de mécanique moléculaire CHARMM (Brooks et coll. 1983) pour calculer l'énergie attribuée à ces 2 modèles : -2532 kcal/mol pour Ccc2_hum et -2640 kcal/mol pour Ccc2_cluster après minimisation d'énergie dans le vide avec contraintes harmoniques de constante de force 5 kcal/mol/Å² sur les atomes lourds jusqu'à un gradient d'énergie inférieur à 0.1 kcal/mol/Å. Ces valeurs d'énergie ne sont sans doute pas très significativement différentes et c'est plutôt l'adéquation avec les données expérimentales qui doit guider le choix du modèle à retenir.

Distances S-S dans les 2 modèles en Å

	Ccc2_cluster	Ccc2_hum
C ⁷⁰⁸ et C ⁷¹⁸	7.5	8.9
C ⁶⁸⁰ et C ⁶⁸⁵	9.1	10.0
C ⁶⁸⁵ et C ⁷¹⁸	> 10	9.3

Nous pouvons noter la proximité entre D⁷²⁸ et C⁷⁰⁸ et C⁷¹⁸ dans le modèle Ccc2_hum, ainsi que la distance entre H⁶⁷⁰ et les différentes cystéines qui est supérieure à 10 Å ce qui est incompatible avec la formation d'un site à cuivre entre l'histidine et les différentes cystéines.

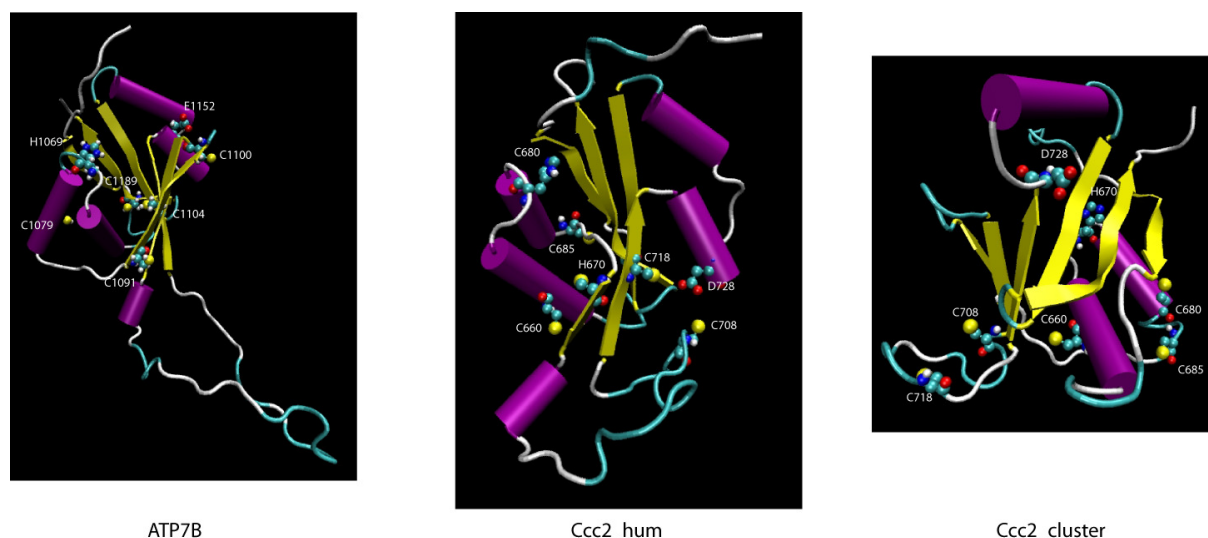


Figure R.2.12 : Structure ou modèle de structure du domaine nucléotidique

ATP7B, structure du domaine nucléotidique de la grande boucle d'ATP7B (Dmitriev et coll. 2006); **Ccc2_hum** : modélisation de la structure de la GBN de Ccc2 à partir d'un alignement de séquence des ATPases humaines avec Ccc2; **Ccc2_cluster** : modélisation de la structure de la GBN de Ccc2 à partir d'un alignement d'un cluster d'ATPases de type P1

L'analyse de ces modèles nous permet d'émettre quelques hypothèses structurales sur la base de nos résultats expérimentaux. Cependant nous devons prendre en compte la variabilité des modèles obtenus qui sont fortement dépendant des paramètres utilisés pour concevoir les alignements de séquence. Les deux modèles présentés ici illustrent parfaitement cette problématique (figure R.2.12). En effet si ces deux modèles présentent, à l'image de la structure d'ATP7B, un repliement général similaire avec un feuillet β central entouré d'hélices α , les acides aminés composant ces structures varient. Ainsi aucune cystéine n'est impliquée dans le feuillet β du modèle Ccc2_cluster, alors que C⁶⁸⁵ et C⁷¹⁸ y participent dans le modèle Ccc2_hum. Ce problème de fiabilité des modèles est dû à la faible homologie entre les différentes séquences des domaines nucléotidiques.

Dans le modèle Ccc2_hum, C⁶⁸⁰ est empaquetée dans le cœur de la protéine entre une hélice α et le feuillet β . Sa mutation en sérine pourrait entraîner une déstabilisation du cœur de la GBN, ce qui expliquerait les difficultés à produire et purifier les mutants C680S et GBNss et donc la faible affinité de GBNss pour le cuivre. C⁶⁸⁰ et C⁶⁸⁵ ne sont pas en position de former un site à cuivre, ce qui corrobore nos observations. Dans ce modèle, C⁷⁰⁸ et C⁷¹⁸, ainsi que D⁷²⁸ sont en position favorable pour participer aux 2 sites à cuivre. En effet C⁷⁰⁸ et C⁷¹⁸ font chacune face à un oxygène de la fonction acide de la chaîne latérale de D⁷²⁸ avec des distances soufre - oxygène de 6 Å entre C⁷⁰⁸ et D⁷²⁸ et de 4 Å entre C⁷¹⁸ et D⁷²⁸. Ces distances sont compatibles avec la formation d'un site de fixation du cuivre.

Dans le modèle Ccc2_cluster, C⁶⁸⁰ et C⁶⁸⁵ appartiennent à une hélice α , C⁶⁸⁵ étant en bordure de l'hélice au contraire de C⁶⁸⁰. La mutation de C⁶⁸⁰ pourrait déstabiliser le packing de cette hélice et entraîner sa disparition. Cette hypothèse est en accord avec les spectres de dichroïsme qui montrent une prévalence plus grande des feuillets β sur les hélices α dans le mutant GBNss par rapport au sauvage. La disparition de l'hélice augmenterait simplement le taux de feuillet par simple glissement des pourcentages. Au contraire du modèle précédent, celui-ci ne fait apparaître qu'un site possible de fixation du cuivre entre les C⁷⁰⁸ et C⁷¹⁸. D'après ce modèle, la mutation en sérine de C⁷⁰⁸ et C⁷¹⁸ ferait disparaître le même site. Cependant, ce modèle pose le problème du second site mis en évidence expérimentalement.

En conclusion, si le modèle Ccc2_cluster est celui dont l'énergie de minimisation est la plus basse donc, la structure la plus stable de deux, il ne s'accorde pas correctement aux données expérimentales, au contraire du modèle Ccc2_hum qui semble expliquer l'ensemble de nos observations.

2.5. Impact des mutations dans le domaine nucléotidique sur la fonctionnalité de Ccc2.

La fonctionnalité des protéines portant les mutations du domaine nucléotidique de Ccc2 que nous venons de décrire a été testée à l'aide du test phénotypique mis au point par Isabelle Morin pendant sa thèse. Le principe de ce test est décrit dans l'introduction (§4.5.3). Brièvement, ce test est basé sur l'interaction entre l'homéostasie du cuivre et du fer. En effet, l'inactivation de Ccc2 est synonyme d'une déficience du transporteur de fer de haute affinité, ce qui provoque un défaut de croissance de la souche dans un milieu carencé en fer et en cuivre. Pour les besoins de sa thèse, Isabelle avait développé un plasmide exotique permettant une très faible expression de Ccc2. Cette faible expression de la protéine permet d'accroître la sensibilité du test et de mettre en évidence des mutations de moindre sévérité. Pendant ma thèse, j'ai développé un plasmide sur la base du pCM183 (Gari et coll. 1997), baptisé pOpH. Ce plasmide porte un promoteur répressible par la tétracycline. L'utilisation de ce plasmide permet en présence de tétracycline dans le milieu de culture de réprimer la transcription de la protéine et donc l'expression, ce qui reproduit les conditions d'expression d'Isabelle Morin. J'ai donc utilisé ce plasmide pour tester la fonctionnalité des mutants du domaine nucléotidique de Ccc2.

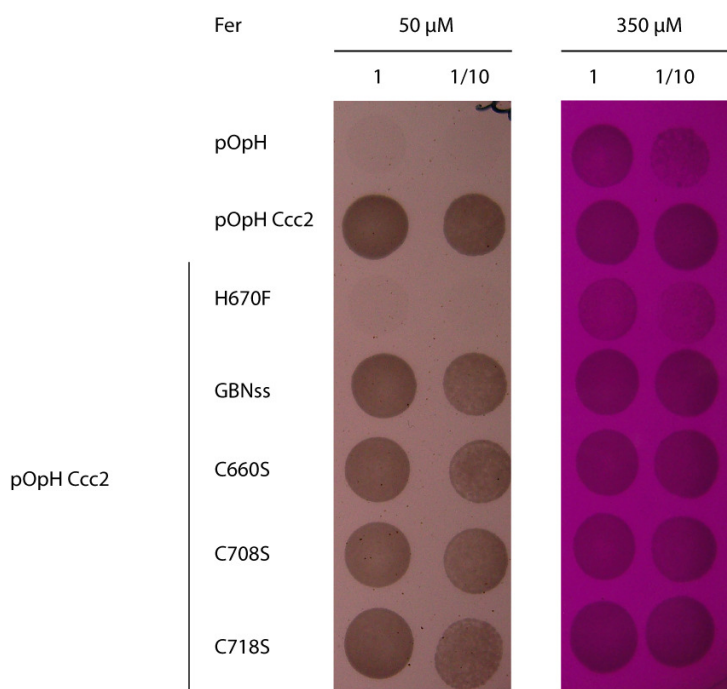


Figure R.2.13 : Expression de Ccc2 sauvage et modifié dans la souche YPH499 *ccc2Δ*
 (ferrozine 1 mM; fer 50 μM pour la carence (à gauche) ou 350 μM (à droite) en présence de doxycycline 25 μg/ml pour réprimer l'expression de Ccc2 par pOpH)

La carence en fer inhibe la croissance de la souche YPH *ccc2Δ* transformée par le plasmide pOpH vide. Par contre, l'expression de Ccc2 permet de restaurer la croissance dans le milieu carencé. Il en est de même pour tous les mutants cystéines, qui ne présentent pas de défaut de croissance significatif par rapport à la protéine sauvage. Il apparaît donc que les deux sites à cuivre que nous avons détectés sur la GBN *in vitro* n'ont pas de rôle majeur dans la fonctionnalité de l'ATPase. Au contraire, le mutant H670F présente un défaut de croissance. L'histidine du motif HP du domaine nucléotidique est décrite dans la littérature comme un acide aminé essentiel, dont la mutation sur ATP7B induit la maladie de Wilson. Cette histidine participerait à la liaison de l'ATP (Morgan et coll. 2004).

2.5. Discussion

Le caractère original des ATPases à cuivre comparées aux ATPases à calcium, potassium ou sodium réside dans l'acquisition du métal dans le site de transport. Alors que ces dernières acquièrent l'ion à transporter par simple diffusion, celui-ci diffusant librement dans le milieu, le cuivre n'est jamais libre dans le cytosol. Le cuivre est fourni aux ATPases à cuivre par l'intermédiaire d'une métallochaperonne. De nombreuses études ont établi le transfert du cuivre des chaperonnes à cuivre aux MBD des ATPases à cuivre. Au cours de sa thèse, Isabelle Morin (2005) a montré par des expériences de complémentation, qu'*in vivo* Atx1 délivre le cuivre au MBD et que le cuivre fixé sur les MBD devait être transféré au reste de la protéine. En effet dans une levure où *CCC2* et *ATX1* sont inactivés, la voie de transfert du cuivre dans le lumen de l'appareil de Golgi ne peut être restaurée que par la co-expression de *Ccc2* et *Atx1*. L'expression de *Ccc2* seule ne permet pas de restaurer le transfert. La co-expression de Δ MBDCcc2 et d'*Atx1* ne restaure pas le transfert, indiquant qu'*Atx1* ne peut pas délivrer le cuivre au site de transport intra-membranaire sans l'intervention des MBD. La co-expression de Δ MBDCcc2 et de MBD1 ou MBD2 sous la forme d'une protéine indépendante permet de restaurer le transfert. Il apparaît donc que les MBD délivrent le cuivre au site de transport intra-membranaire, directement ou indirectement.

Nous avons ici exploré l'hypothèse d'un transfert indirect du cuivre depuis le MBD vers le site intra-membranaire de transport via la GBN de *Ccc2*. Cette hypothèse vient principalement de deux constats. Le premier est l'existence d'une interaction *in vitro* entre la GBN d'ATP7B et ses MBD, interaction qui est affaiblie par la présence de cuivre (Tsivkovskii et coll. 2001). Le second se base sur l'analyse des séquences des GBN d'ATP7A, d'ATP7B et de *Ccc2* qui possèdent toutes un motif HP/Cx_{3/4}C (Annexe 3), dans lequel histidine et cystéines sont connues pour coordonner le cuivre dans la protéine Sco1 (Balatri et coll. 2003).

Dans ce chapitre nous avons produit et purifié la GBN de *Ccc2* et mis en évidence sa capacité à fixer le cuivre (Résultats §2.1.2). Mais nous avons aussi montré qu'aucun de nos mutants, à l'exception du mutant H670F, n'affectent le transfert du cuivre *in vivo*, quand bien même certains affectent la liaison du cuivre sur la GBN (Résultats §2.2.2 et §2.3.1). Il est nécessaire de rappeler ici, que l'histidine du motif HP est connue par ailleurs pour l'effet délétère de sa mutation en glutamine sur ATP7A (Voskoboinik et coll. 2003) et ATP7B

(Payne et coll. 1998) et que la GBN H670F lie toujours 2 cuivres (Résultats §2.2.2) indiquant que l'impact délétère de cette mutation n'est pas due à un problème de liaison du cuivre sur la GBN. Il semble donc que si la fixation du cuivre sur la GBN que nous avons découverte à un rôle physiologique, il ne s'agit pas d'une implication directe dans le cycle catalytique de l'ATPase. Comme nous le suggérons dans le chapitre précédent, la liaison du cuivre sur la GBN pourrait avoir un rôle régulateur que nous ne pouvons pas mettre en évidence simplement par ce test phénotypique. Cette régulation pourrait être liée à celle de la distribution intracellulaire de Ccc2, mais pourrait également permettre une régulation de l'activité catalytique.

Nos expériences de complémentation *in vivo* de la voie Atx1-Ccc2 avec différents mutants du N-terminal de Ccc2 nous apprennent que le mutant M1ssM2ssCcc2 ne rétablit pas la croissance de la souche *atx1Δccc2Δ* en présence d'un MBD exprimé indépendamment, alors que le mutant Δ MBDCcc2 en est capable. De plus, le mutant M1ssM2ssCcc2 n'est pas phosphorylable *in vitro* en présence de cuivre contaminant, contrairement au mutant Δ MBDCcc2. L'existence d'une interaction entre la GBN et le N-terminal d'ATP7B qu'affaiblit la présence de cuivre, suggère que la défaillance du mutant M1ssM2ssCcc2 par rapport au mutant Δ MBDCcc2 est due à un blocage de l'ATPase dans une conformation inactive via une interaction entre la GBN et le N-terminal stabilisée par la substitution des sérines en cystéines. En effet la présence de sérines empêchant la fixation du cuivre sur le N-terminal, le changement de conformation induit par la liaison du cuivre sur le N-terminal n'est plus possible (Huster et Lutsenko 2003; Walker et coll. 2004). Cette hypothèse d'un blocage dans une conformation inactive est renforcée par nos expériences de dosage du cuivre sur la souche *ccc2Δ* exprimant le mutant M1ssM2ssCcc2 qui montrent que ce mutant est fonctionnel lorsque la concentration en cuivre augmente dans la cellule (figure R.1.23). La mutation du N-terminal se traduit donc par une diminution de la sensibilité au cuivre de l'activité de Ccc2.

Jusqu'à présent le passage de la forme inactive à la forme active de Ccc2 était supposé dû au changement de conformation induit par la fixation du cuivre sur les MBD. Mais la possibilité d'un déblocage de l'activité du mutant M1ssM2ssCcc2 tel que nous l'observons et l'existence de site de liaison du cuivre sur la GBN nous amène à penser que cette dernière pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'activité catalytique de Ccc2. En effet cette hypothèse expliquerait l'activité observée en présence d'une concentration élevée de cuivre dans la cellule alors que M1ssM2ssCcc2 ne peut fixer de cuivre sur son N-terminal. Pour

évaluer cette hypothèse, il faudra chercher un site de fixation du cuivre sur la GBN de M1ssM2ssCcc2 en y modifiant les acides aminés que nous avons identifiés dans ce chapitre. L'activité de ces nouveaux mutants pourra être évaluée par le dosage du contenu en cuivre des levures cultivées en présence de 500 μ M de cuivre dans le milieu de culture. De plus, s'il s'avère que certains mutants sont inactifs *in vivo*, nous pourrions vérifier leur participation au cycle catalytique en recherchant *in vitro* les conditions d'obtention de la phosphorylation auto-catalytique de M1ssM2ssCcc2.

L'hypothèse d'un site intermédiaire entre les MBD et le site intra-membranaire de transport est toujours envisageable, mais des données récentes plaident pour un transfert direct des MBD vers le site de transport intra-membranaire. En avril 2008, Gonzalez-Guerrero et Argüello ont montré que CopZ, la métallochaperonne de l'archaebactérie *A. fulgidus*, pouvait activer directement la phosphorylation auto-catalytique de l'ATPase à cuivre CopA tronquée de ses MBD. De plus, ces auteurs mettent en évidence *in vitro* un transfert direct du cuivre de CopZ dans le site intra-membranaire de CopA- Δ MBD par une expérience qui mélange des micelles ternaires composées de CopA- Δ MBD, détergent, lipides et CopZ. L'ensemble de leurs données suggère un transfert direct du cuivre de CopZ au site intra-membranaire de CopA et un rôle strictement régulateur des MBD.

Le transfert direct d'Atx1 au site intra-membranaire de Ccc2 n'est pas envisageable d'après nos données expérimentales *in vivo* (cf. 1^{er} paragraphe de cette discussion). Pour les ATPases à cuivre humaines, une collection de données *in vitro* indique un transfert du cuivre d'Atox1 aux MBD (Introduction §4.3.2) et au moins pour ATP7B, MBD2 active l'ATPase en transférant le cuivre au reste de la protéine (Walker et coll. 2004). Cependant, l'ensemble de ces données nous éclairent sur la possibilité d'un transfert direct du cuivre des MBD au site intra-membranaire dans les ATPases à cuivre eucaryotes, malgré le problème que pose l'accessibilité au site. En effet, dans les structures d'ATPases à notre disposition les domaines cytoplasmiques surplombent le site de transport, le rendant difficilement accessible (figure D.2.1).

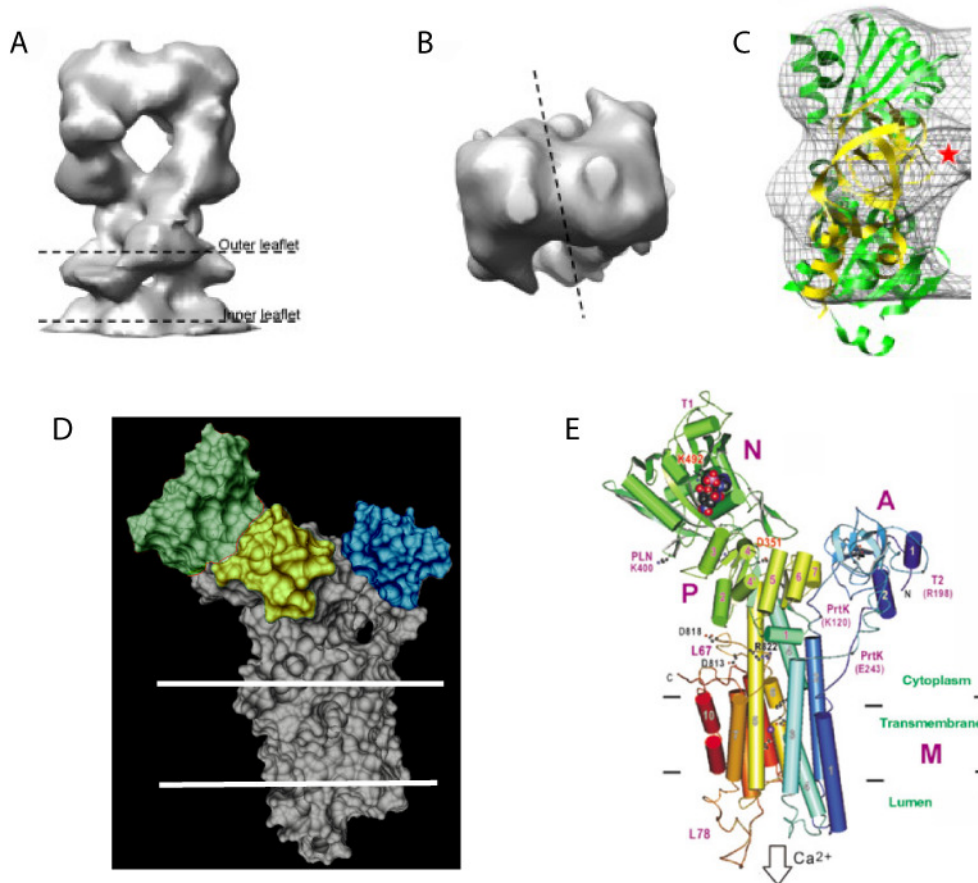


Figure D.2.1 : Comparaison entre la structure de CopA d'*A. fulgidus* (A, B, C) et de l'ATPase à calcium du réticulum sarcoplasmique (D, E)

A et B Structure d'un dimère de CopA à une résolution de 17Å, **A** vue de côté, **B** vue du dessus : la séparation entre les 2 monomères est représentée par la ligne pointillée. **C** Modélisation de la structure de CopA d'après la structure cristallographique de CopA et celle de l'ATPase à calcium (Wu et coll. 2008) **D** Structure de l'ATPase à calcium à une résolution de 2,5 Å (1SU4.pdb) **E** Représentation schématique de l'ATPase calcium (Toyoshima et coll. 2000)

Néanmoins comme le montrent les structures issues de la cristallisation des différentes étapes du cycle catalytique de Serca en présence d'analogues d'ATP, les ATPases semblent être étonnamment flexibles, autorisant d'importants mouvements des domaines cytoplasmiques pouvant peut-être libérer l'accès du intra-membranaire aux MBD (figure D.2.2).

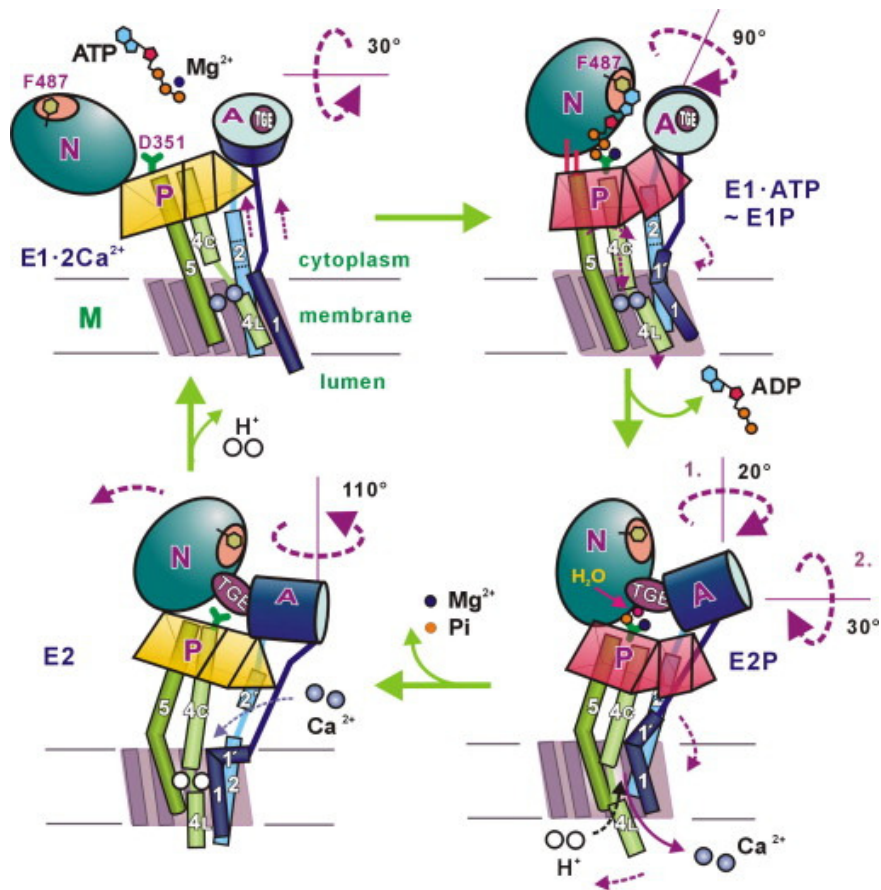


Figure D.2.2 : Représentation schématique des structures adoptées par l'ATPase à calcium au cours de son cycle catalytique. Visualisation des mouvements supposés de l'ATPase à calcium (Toyoshima et coll. 2004)

Récemment nous avons commencé à étudier l'hypothèse d'un transfert direct du cuivre au site intra-membranaire. Dans un premier temps nous avons cherché à mettre en évidence une affinité des MBD pour les membranes lipidiques. En effet, le site de transport étant enfoui dans les membranes, il est probable que les MBD doivent pouvoir interagir avec la membrane pour atteindre le site de transport. Des mises au point sont encore nécessaires avant de pouvoir réaliser cette expérience. Dans un second temps, nous pourrions comparer la phosphorylation auto-catalytique de Ccc2 et de Δ MBDCcc2 *in vitro* en présence d'Atx1 ou de MBD1 comme seule source de cuivre disponible dans le milieu tel que réalisé sur ATP7B (Walker et coll. 2004). Ces deux séries d'expériences devraient nous permettre de répondre à cette question et de déterminer si les ATPases eucaryotes fonctionnent de la même façon que les ATPases bactériennes, ou si leur mécanisme a dérivé avec l'évolution.

Matériels et Méthodes

1. Souches et milieux de culture

1.1. Souches et milieux de culture bactériens

Les amplifications de plasmides ont toutes été réalisées dans des bactéries *E. coli* XL1-Blue (Stratagene). La production de protéines recombinantes solubles a été réalisée dans les bactéries M15 (Quiagene) rendues compétentes au préalable par la méthode du chlorure de calcium (Dagert et Ehrlich 1979). Les bactéries sont cultivées dans le milieu riche LB Broth Sigma (tryptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 5 g/l). L'antibiotique utilisé pour la sélection des bactéries après transformation est l'ampicilline, à une concentration de 100 µg/ml. Les bactéries M15 sont entretenues en présence de kanamycine à une concentration de 25 µg/ml pour maintenir la présence du plasmide pREP4 contenant le répresseur du promoteur lac.

1.2. Souches et milieux de culture de levure

Au cours de cette étude deux souches de levure ont été utilisées. La première est la souche parentale YPH499 (MATa *ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his-Δ200 leu2-Δ1* (Sikorski et Hieter 1989), fournie par le Dr. Pierre Thuriaux (CEA, Saclay). Cette souche est principalement utilisée pour tester la fonctionnalité de Ccc2 *in vivo*, en milieu carencé en fer et en cuivre. La seconde est la souche parentale BY4741 (MATa *his3Δ1 leu2 Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) (Brachmann et coll. 1998), fournie par le Dr Naima Belgareh (Institut Jacques Monod, Paris). Cette souche a été utilisée pour la localisation de Ccc2 et l'étude de la sensibilité au cuivre de la levure. Au cours des expériences un certain nombre de mutants de ces souches ont été utilisés, leurs caractéristiques sont regroupées ci-dessous (Tableau M.1.1). Ces souches sont cultivées en milieu riche YPD constitué de glucose 20 g/l, extrait de levure 10 g/l et peptone 20 g/l, dissous dans l'eau ou en milieu synthétique SC constitué de YNB (Yeast Nitrogen Base) 6,7g/l, CSM-Leu-His-Trp-Ura 0,6 g/l (mélange comprenant tous les acides aminés sauf la leucine, l'histidine, le tryptophane et l'uracile) et de glucose 20g/l

dissous dans l'eau. Du bacto-agar est ajouté à la concentration de 20 g/l afin de constituer un milieu solide.

Souche	Génotype	Origine
YPH499	MATa ura3-52; lys2-801; ade2-101; trp1-Δ63; his-Δ200; leu2-Δ1	P. Thuriaux CEA Saclay
YPH499 <i>ccc2Δ</i>	MATa ura3; lys2-801; ade2-101; trp1-Δ63; his-Δ200; leu2-Δ1; <i>ccc2::ura3</i>	I. Morin 2005
YPH499 <i>ccc2Δ atx1Δ</i>	MATa ura3; lys2-801; ade2-101; trp1; his-Δ200; leu2-Δ1; <i>ccc2::ura3</i> ; <i>atx1::trp1</i>	I. Morin 2005
BY4741	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0	N. Belgareh IJM Paris
BY4741 <i>ccc2Δ</i>	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; <i>ccc2::kanMX4</i>	N. Belgareh IJM Paris
BY4741 <i>ccc2Δctr2Δ</i>	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; <i>ccc2::kanMX4</i> ; <i>ctr2::his5</i>	cette étude
BY4741 <i>ctr2Δ</i>	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; <i>ctr2::his5</i>	cette étude
BY4741 <i>end3Δ</i>	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; <i>end3::kanMX4</i>	N. Belgareh IJM Paris
BY4741 <i>vps27Δ</i>	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; <i>vps27::kanMX4</i>	N. Belgareh IJM Paris
BY4741 <i>aps3Δ</i>	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; <i>aps3::kanMX4</i>	N. Belgareh IJM Paris
BY4741 Ccc2-GFP	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDR270W-GFP::kanMX6	N. Belgareh IJM Paris
BY4741 Ccc2-HA	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDR270W-3HA::his5	cette étude
BY4741 Sec13-RFP	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR208W-RFP::kanMX6	N. Belgareh IJM Paris
BY4741 Sec7-RFP	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDR170C-RFP::kanMX6	N. Belgareh IJM Paris
BY4741 Chc1-RFP	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YGL206C-RFP::kanMX6	N. Belgareh IJM Paris
BY4741 Snf7-RFP	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR025W-RFP::kanMX6	N. Belgareh IJM Paris

Table M.1 : phénotype et origine des souches de levure utilisée.

2. Biologie Moléculaire

2.1. Clonage et mutagenèse

2.1.1. PCR

La PCR ou 'Polymerase Chain Reaction' est une technique de réplication ciblée de l'ADN *in vitro*. Imaginée par K. Mullis en 1985 (Saiki et coll. 1985), elle permet d'obtenir à partir d'un échantillon complexe et peu abondant une quantité exponentielle d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN est réalisée en mettant en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' - pointent l'une vers l'autre. Ces amorces définissent la séquence à amplifier. L'enzyme utilisée est l'ADN polymérase *Pfu* Turbo (Stratagene) de haute fidélité. Tous les produits de PCR ont été séquencés par la société Cogenics Génome Express à Meylan.

2.1.1. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée permet d'effectuer des mutations ponctuelles sur l'ADN plasmidique double-brin. Elle est basée sur l'amplification d'un plasmide par des amorces portant la mutation désirée grâce à la *Pfu*. Une première étape de dénaturation à 95 °C permet de séparer les brins d'ADN plasmidiques (fig.M.1). L'étape suivante est l'hybridation des amorces contenant la mutation d'intérêt, déclenchée par une baisse de la température. Puis le premier cycle d'élongation génère un nouveau plasmide muté qui sera amplifié lors des cycles suivants. Afin d'augmenter l'efficacité de la mutagenèse, les plasmides parentaux originellement méthylés sont digérés spécifiquement par l'enzyme de restriction DpnI (Fermentas). Le produit de PCR ainsi créé est amplifié dans les bactéries XL1-Blue, et analysé par digestion enzymatique.

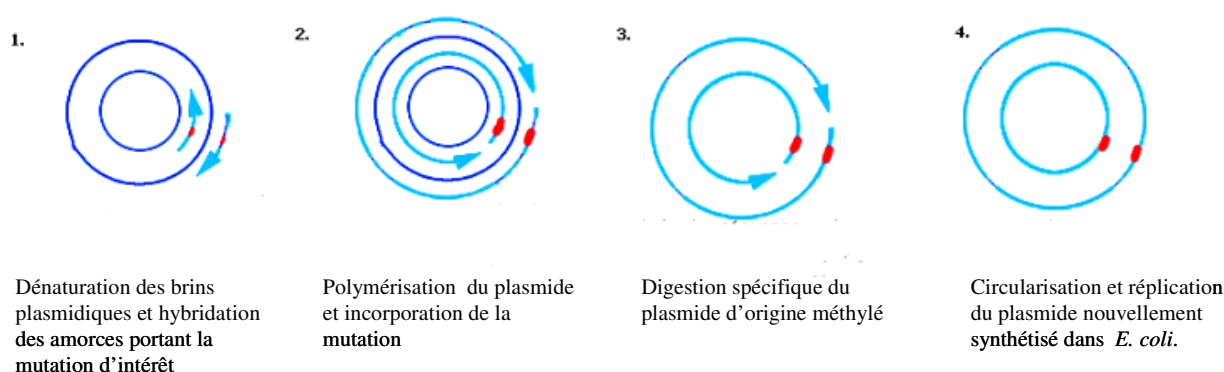


Figure M.1 : Etapes de la mutagenèse dirigée

2.2. Purification d'ADN sur gel d'agarose

Les extractions d'ADN des gels d'agarose ont été réalisées grâce au kit GENE-CLEAN® Turbo de Q-BIOgene. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant qui permet de visualiser l'ADN sous rayonnement UV. Les bandes d'intérêt ainsi repérées sont découpées et fondues à 55 °C dans un tampon enrichi en sels chaotropiques qui favorisent la liaison de l'ADN sur une colonne de silicate. Après deux lavages par une solution saline contenant 80 % d'éthanol, l'ADN est élué de la colonne par une solution aqueuse dont la concentration en sel est fortement diminuée. Cette solution permet une réhydratation de la matrice de silicate qui défavorise les interactions avec l'ADN et permet donc l'élution. La quantification d'ADN ainsi purifié est réalisée par dépôt d'un échantillon sur gel d'agarose.

2.3. Purification d'ADN plasmidique

La préparation d'ADN plasmidique à partir de 2 ml de cultures bactériennes est appelée mini-prep (Feliciello et Chinali 1993). Cette préparation permet ensuite de cribler les clones d'intérêts par digestion. Cette méthode repose sur une dénaturation différentielle de l'ADN génomique dont la structure est relâchée et de l'ADN plasmidique d'intérêt qui est super-enroulé. Les cellules sont suspendues dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl à pH 8, 10 mM EDTA à pH 8 et 100 µg/ml RNase A. Puis elles sont lysées en présence de SDS 1 % et 200 mM NaOH. L'ADN génomique est alors irréversiblement dénaturé. Après neutralisation à l'acétate de potassium, les débris cellulaires et l'ADN génomique sont précipités par une simple centrifugation. L'ADN plasmidique soluble est précipité en présence d'isopropanol. Le culot obtenu est alors lavé à l'éthanol 70 %, séché et suspendu dans 20 µl d'eau. La préparation d'ADN plasmidique à partir de 100 ml de culture est appelée midi-prep. La méthode est similaire sauf pour l'utilisation d'une résine échangeuse d'ions qui permet de purifier efficacement l'ADN plasmidique. La midi-prep est utilisée à l'étape finale d'un clonage pour obtenir une quantité élevée de plasmide. Elle est également adoptée de préférence à la mini-prep pour le séquençage.

2.4. Extraction d'ADN génomique de levure

Une culture de levure de 5 ml dans du YPD est mis en culture pendant toute la nuit à 30 °C sous agitation. Les levures sont récoltées par centrifugation (15000 g, 1 min) et lavées avec 1 ml d'eau distillée à température ambiante. La paroi des levures est digérée par la lyticase dans 200 µl de tampon de digestion (1 % v/v β-mercaptoéthanol, 0,2 mg/ml lyticase (Sigma), 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA) pendant 2 h à 37 °C. Les levures sont ensuite lysées par ajout de 200 µl de tampon de lyse (0,2 M NaOH, 1% v/p SDS) et incubées 20 min à 65 °C. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans la glace 15 min et en ajoutant 200 µl d'acétate de potassium 3M. Les débris cellulaires sont séparés du surnageant par centrifugation (15000 g, 3 min), l'ADN est précipité par 0,6 volume d'isopropanol et une nouvelle centrifugation (15000 g, 1 min). Les culots d'ADN sont lavés à l'éthanol 70 % et

centrifugés (15000 g, 5 min) à température ambiante puis séchés à 37 °C. L'ADN est repris dans 50 µl d'eau distillée stérile.

2.5. Vecteur plasmidique

Les gènes d'intérêt ont tout d'abord été clonés dans le site de clonage multiple du pSP72 (Promega), avant d'être séquencés puis sous-clonés dans différents vecteurs d'expression levuriens ou bactériens.

2.5.1. Vecteurs d'expression dans la levure

- pCen : Ce plasmide est un dérivé du pRS315 (Sikorski et Hieter 1989). Il s'agit d'un vecteur monocopie (ou centromérique), car il contient une origine de réplication CEN/ARS (Centromer/Autonomously Replicating Sequence) qui lui permet de se répliquer en phase avec la réplication du génome levurien. Ce plasmide porte également le gène de sélection *LEU2*. La transcription du gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur fort et constitutif de PMA1 (promoteur de l'ATPase à protons Pma1) qui permet l'expression des gènes clonés.

- pCM183 : ce plasmide nous a été offert par le Dr E. Herrero (Lleida, Espagne). Ce plasmide est un vecteur monocopie avec une origine de réplication CEN/ARS. L'expression du gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur répressible tetO-CYC1. Ce système permet d'éteindre de façon graduelle l'expression du gène d'intérêt par l'ajout de tétracycline ou de ses homologues dans le milieu. Ce plasmide porte également le gène de l'activateur transcriptionnel tTA sous le contrôle du promoteur fort CMV (CytoMegalovirus). Le marqueur de sélection de ce plasmide est *TRP1* (marqueur tryptophane). Au cours de cette étude ce gène a été remplacé par *HIS3* (marqueur histidine). Le nouveau plasmide ainsi obtenu a été renommé pOpH.

2.5.2. Vecteurs bactériens

Le plasmide pQE60 est un plasmide de surexpression de protéines recombinantes de Qiagen. Il possède une origine de réplication ColE1 pour la réplication chez *E. coli* et le gène de la β -lactamase conférant à la bactérie une résistance à l'ampicilline. L'expression du gène

d'intérêt est sous le contrôle du promoteur fort T5 en aval duquel sont disposées deux séquences de fixation du répresseur transcriptionnel LacI de l'opéron lactose, permettant de contrôler l'expression de la protéine d'intérêt. Vient ensuite une cassette de clonage contenant les sites de restriction NcoI, BamHI et BglII qui permettent le clonage du gène d'intérêt en phase avec le cadre de lecture du codon initiateur du promoteur. Enfin, ce plasmide possède une séquence de 6 histidines, suivie du site HindIII en amont des codons stop, ce qui permet d'étiqueter la protéine d'intérêt de 6 histidines en position C-terminale pour faciliter sa purification sur colonne d'affinité au nickel.

2.6. Construction des vecteurs plasmidiques

2.6. 1. Construction du pQE60-GBN et des mutants de la GBN

La séquence de la grande boucle nucléotidique de Ccc2 (GBN) (Annexe 3) a été extraite par PCR depuis le plasmide psp72-Ccc2 (Lowe et coll. 2004) à l'aide des oligonucléotides GBN1 et GBN2 (Annexe 2). L'oligonucléotide GBN1 contient le site de restriction NcoI en phase avec le cadre de lecture de la protéine et celui du codon initiateur du pQE60. L'oligonucléotide GBN2 contient un codon stop suivi du site de restriction HindIII. L'intégration d'un codon stop dans la séquence de la GBN en amont du codon stop prévu dans le plasmide permet de ne pas étiqueter la GBN de 6 histidines. En effet si l'étiquette histidine facilite la purification de nombreuses protéines solubles sans avoir de conséquences pour leur fonction grâce à sa petite taille et à sa grande affinité pour les métaux, cette dernière propriété peut poser problème lorsque l'on travaille précisément sur des protéines à métaux. C'est pourquoi nous avons décidé de nous affranchir de cette étiquette. Le fragment de PCR a été ensuite directement cloné dans le pQE60 à l'aide des sites de restriction NcoI/HindIII porté par les oligonucléotides GBN1 et 2. Le plasmide obtenu a été séquencé pour vérifier que la séquence de la GBN n'avait pas été altérée au cours de la PCR.

Tous les mutants de la GBN ont été directement réalisés par mutagenèse dirigée sur le pQE60-GBN. La présence de la mutation a été vérifiée par séquençage et la séquence mutée de la GBN a été sous clonée dans un pQE60 qui n'a pas subi la PCR. Les amorces des PCR de chacune des mutations sont disponibles en Annexe 2.

2.6.2. Construction des vecteurs codant pour les protéines Ccc2-GFP modifiées

Le plasmide pCen-Ccc2-GFP qui a servi de base à cette étude a été construit au cours de la thèse d'Isabelle Morin (Morin 2005). Isabelle a également réalisé les constructions des plasmides pCen-M1ssCcc2-GFP que nous avons utilisé pour notre étude.

- pCen-M1ssM2ssCcc2-GFP : ce plasmide a été construit par sous-clonage à partir de pCen-Ccc2-GFP et de pYep-M1ssM2ssCcc2 (Morin 2005) qui a fourni l'insert contenant M1ssM2ss par restriction AvrII/SacII.
- pCen-ΔMBDCcc2-GFP : la protéine ΔMBDCcc2 est une protéine Ccc2 tronquée des acides aminés 1 à 151 qui correspondent aux MBD de l'ATPase. La construction a été réalisée par PCR sur le psp72-Ccc2 par la mutation de la glycine 151 par une méthionine de Ccc2 et l'insertion du site de coupure EcoRI 10 nucléotides en amont du codon de la méthionine.
- pCen-Ccc2-TGE-AAA-GFP: la protéine TGE-AAA est une protéine dont le motif T⁴⁶⁴GE a été entièrement muté en alanine. La mutation a été réalisée par PCR sur le psp72-Ccc2 puis transférée, après séquençage, sur le pCen-Ccc2-GFP par restriction NsiI/AvrII
- pCen-Ccc2-D627A-GFP : ce plasmide a été construit par sous-clonage à partir de psp72-Ccc2-D627A (Lowe et coll. 2004) et de pCen-Ccc2-GFP par restriction NsiI/AvrII.

2.6.3. Construction du pOpH Ccc2 et mutant

Le plasmide pOpH-Ccc2 dérive du pCM183. Ccc2 a été inséré par restriction StuI/PstI à partir du psp72-Ccc2. Le gène de sélection *TRP1* porté par le pCM183 a été remplacé par *HIS3*. Nous avons extrait *HIS3* du plasmide YDpH (Berben et coll. 1991) par restriction BamHI, dont nous avons rendu les extrémités franches à l'aide du fragment de Klenow pour l'insérer dans le pCM183 linéarisé par PmlI/EcoRV. Le nouveau plasmide est renommé pOpH-Ccc2.

Toutes les mutations à apporter à pOpH-Ccc2 ont été obtenues par PCR sur psp72-Ccc2 en utilisant les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés sur le pQE60, puis elles ont été sous-clonées dans pOpH par restriction StuI/SbfI.

3. Biologie cellulaire

3.1. Transformation de levure

Les levures sont rendues compétentes selon la méthode d'Ito qui utilise l'acétate de lithium (Ito et coll. 1983). La sélection des clones transformés par le plasmide d'intérêt est réalisée en milieu minimum DOB (Dropout Base Broth, Q-BIOgene) complété en acides aminés ou nucléotides selon le marqueur de sélection porté par le plasmide.

3.2. Caractérisation phénotypique sur milieu gélosé

Après transformation, une quinzaine de clones sont sélectionnés et repiqués sur milieu minimum. Au bout de 24 h, les clones sélectionnés sont suspendus en milieu liquide sélectif pour 24 h sous agitation à 200 rpm. Les cultures sont ensuite ajustées à $DO_{600} = 1$, soit une concentration cellulaire d'environ $1,9 \times 10^7$ cellules/ml. Des gouttes de chaque clone sont ensuite déposées sur un milieu gélosé test et le taux de croissance est estimé après incubation de 72 h à 30 °C.

3.2.1. Tests phénotypiques en milieu carencé en fer et en cuivre

Les milieux de ce test sont constitués de DOB 26,7 g/l, de CSM-Leu-His-Trp-Ura 0,6 g/l (mélange comprenant tous les acides aminés sauf la leucine, l'histidine, le tryptophane et l'uracile), de MES 9.76 g/l et de ferrozine, un chélateur spécifique du fer. La ferrozine est utilisée à 1 mM pour les tests effectués dans les souches *ccc2Δ* et *atx1Δccc2Δ*. Le fer est ajouté sous la forme de sel de Mohr (sulfate ferreux d'ammonium). Deux concentrations de fer sont préparées, 50 μM pour le milieu carencé en fer et 350 μM pour le milieu non carencé. Enfin, le pH est ajusté à 6,1 par de la soude concentrée (NaOH 10 M) et les milieux sont stérilisés. Pour les tests phénotypiques utilisant le plasmide pOpH, la doxycycline est ajoutée à 25 μg/ml à partir d'une solution initiale de doxycycline hyclate (Sigma-Aldrich) à 5 mg/ml (eau/éthanol 50 % v/v). L'utilisation de ces différents milieux permet de déterminer si l'homéostasie du cuivre a été restaurée dans les levures qui expriment les protéines d'intérêt. En présence de 1 mM de ferrozine, la concentration de 50 μM de fer permet de distinguer les levures dont la voie Atx1-Ccc2 est fonctionnelle de celles dont le transfert du cuivre entre ces

deux protéines partenaires est altéré. Une concentration plus élevée de fer (350 μ M) permet au fer non lié à la ferrozine d'entrer dans la cellule par les transporteurs de basse affinité et la croissance des levures ne nécessite plus de système d'import de fer de haute affinité. En d'autres termes, ce milieu permet la croissance de souches dont la voie Atx1-Ccc2 est déficiente. L'ajout de la doxycycline permet de contrôler la transcription de Ccc2 de telle sorte que le test phénotypique ne soit pas biaisé par la présence d'une concentration non physiologique de la protéine Ccc2. En effet, de telles concentrations pourraient entraîner de faux négatifs ou faux positifs (Morin 2005).

3.2.2. Test phénotypique de sensibilité au cuivre et à l'argent

Les milieux de ce test sont constitués de DOB 26,7 g/l et CSM-Leu-His-Trp-Ura 0,6 g/l, comme les milieux précédents. Le cuivre, sous la forme d'une solution stérile de sulfate de cuivre 1 M ou l'argent, sous la forme d'une solution stérile de nitrate d'argent 10 mM, sont ajoutés dans le milieu après stérilisation.

3.3. Modification génétique de la souche BY4741

3.3.1. Construction des souches *ctr2* Δ

Afin d'invalider le gène *CTR2* dans les souches BY4741 et BY4741 *ccc2* Δ , nous avons utilisé le protocole mis au point par (Longtine et coll. 1998). Dans cette méthode, une cassette de délétion contenant un gène de sélection est intégrée par recombinaison homologue au locus chromosomique du gène à invalider. En pratique cette méthode est basée sur un ensemble de plasmides optimisés, la série des pFA6a, contenant la cassette de délétion. La cassette est extraite par PCR grâce à des oligonucléotides hybrides dont la première partie, constituée d'une vingtaine de nucléotides, s'hybride sur le plasmide afin de permettre la PCR, et la seconde partie d'une quarantaine de nucléotides est homologue à la séquence du gène à invalider. Le produit de PCR obtenu est purifié et utilisé pour transformer la souche dont on souhaite invalider un gène. La délétion du gène *CTR2* a été réalisée par insertion du gène *HIS5*⁺ de *Schizosaccharomyces pombe* dans la partie centrale de *CTR2* à partir du plasmide pFA6a-His3MX6 grâce aux couples d'amorces CTR2F1/CTR2R1 (Annexe 2). Les clones

ayant intégré la cassette de délétion ont été sélectionnés sur un milieu DOB sans histidine, puis l'intégration au locus a été vérifiée par PCR sur l'ADN génomique grâce aux amorces CTR2a/CTR2b (Annexe 2). En effet, le produit de la PCR permet de visualiser l'intégration de la cassette de délétion dans le gène *CTR2* par un fragment dont la taille doit être de 1949 pb au lieu de 546.

3.3.2. Construction de la souche Ccc2-HA

Afin de détecter Ccc2 par « western blotting » et en absence d'anticorps spécifique contre cette protéine, nous avons intégré une étiquette HA en C-terminal de la séquence codante de Ccc2. Pour réaliser cette insertion, nous avons procédé comme précédemment (3.3.1) en utilisant le plasmide pFA6a-His3MX-3HA et le couple d'amorce YPHF1/YPHR1 (Annexe 2) en phase avec le cadre de lecture de Ccc2. Les clones ayant intégré la cassette de délétion ont été sélectionnés sur un milieu DOB sans histidine. La présence de l'étiquette HA au locus de Ccc2 a été vérifiée par immunodétection avec un anti-corps anti-HA.

3.4. Localisation de Ccc2 en microscopie de fluorescence

Des levures fraîchement transformées avec pCen-Ccc2-GFP sont mises en préculture pendant la nuit de telle sorte que la culture soit en phase exponentielle de croissance le matin. La préculture est alors diluée dans du milieu frais et cultivée jusqu'à l'obtention d'une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,4 et les levures sont exposées à la concentration de cuivre choisie par addition de CuSO_4 ou de BCS dans le milieu de culture. Après un temps d'incubation d'une génération permettant d'atteindre une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,8, les levures contenues dans 1 ml de culture sont récoltées par centrifugation et reprises dans 20 μl du milieu de culture. 2,3 μl sont observés entre lame et lamelle grâce à un microscope Axiovert 200 M (Zeiss) et un objectif x 100, par contraste de phase interférentiel, encore appelé Nomarski (du nom de l'inventeur de la technique) ou par fluorescence avec le filtre approprié. Les images sont acquises avec une camera CCD AxioCam Mrm et le programme Axiovision et traitées avec Photophop (Adobe).

3.5. Dosage du cuivre

3.5.1. Dosage du cuivre sur cellules entières

Les levures sont mises en préculture pendant une nuit à partir des cultures sur milieu gélosé. Le lendemain matin, 50 ml de culture sontensemencés à la DO_{600nm} de 0,1 dans un milieu synthétique. Lorsque les cultures ont atteint la DO_{600nm} de 0,4 le traitement approprié est appliqué aux cultures pendant une génération, les cultures atteignant alors la DO_{600nm} de 0,8. Trois échantillons de 12 ml de culture, soit 15×10^6 cellules, sont récoltés par centrifugation (5000 g, 10 min, 4 °C). Trois lavages successifs différents sont appliqués sur les cultures pour éliminer toute trace de cuivre dans le milieu et dans la paroi des levures. Le premier est réalisé avec un mélange eau – EDTA 1 mM, le second dans un mélange BCA 50 μ M/BCS 50 μ M et le dernier est un rinçage à l'eau distillée. Les culots séchés pendant la nuit à 50 °C sont repris dans une solution de TMAH (tétraméthylammonium hydroxide) 10 %. Le cuivre des différents échantillons est dosé par ICP-AES au CHU de Grenoble (Département de Biologie Intégrée, Dr Josiane Arnaud). La quantité totale de cuivre dans l'échantillon est calculée à partir de la concentration en cuivre de la solution minéralisée, puis rapportée au nombre de cellules.

3.5.2. Dosage du cuivre sur vacuoles isolées

Les vacuoles entières isolées sont obtenues dans un tampon 0.6 M sorbitol 10 mM MES-NaOH (pH 6,8), d'après le protocole décrit par (Sarry et coll. 2007) (cf §4.5). Les échantillons sont minéralisés par ajout de 50 μ l de TMAH 10 % pour 150 μ l de préparation de vacuoles. Le cuivre est dosé par ICP-AES et la quantité totale de cuivre de l'échantillon est rapportée à la concentration de protéines mesurée dans la préparation de vacuoles (cf §4.2). Les résultats sont présentés en ng de cuivre pour 50 μ g de protéines.

4. Biochimie

4.1. Production et purification de protéines recombinantes

Nous avons cloné les séquences des protéines à purifier dans le plasmide d'expression pQE60 (cf §2.6.1) et le plasmide a été utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* M15 (Qiagen) contenant un plasmide répresseur pREP4 portant la résistance à la kanamycine. Un ml d'une culture de bactéries à saturation est utilisé pour ensemercer 500 ml de LB contenant 100 µg/l d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine. Après 12 h de culture à 37 °C sous agitation, 500 ml de LB sont ajoutés à la culture et la température de l'incubateur est abaissée à 15 °C. L'expression du gène d'intérêt est induite par l'ajout de 2 mM d'IPTG et se prolonge pendant 24 h. La culture est récoltée par centrifugation et le culot est suspendu dans 55 ml de tampon de lyse (100 mM NaH₂PO₄-NaOH (pH 6), 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, cocktail d'antiprotéases (complete EDTA-free, Roche Applied Science). La lyse est réalisée par sonication dans un mélange eau/glace. Les protéines sont séparées des débris cellulaires par centrifugation (100000 g, 30 min, 4 °C). Le pH du surnageant est ajusté à 3,25 puis le surnageant est incubé 1 h à 4 °C sous agitation pour précipiter les protéines de la bactérie. La séparation entre les protéines solubles du mélange et les protéines précipitées est réalisée par centrifugation (100000 g, 30 min, 4 °C). Le mélange est réduit par l'ajout de 1 mM de TCEP et 400 mM de NaCl. Le pH est ajusté à 6 et le mélange concentré 50 fois par centrifugation (3500 g, 2 h, 4 °C) dans des concentrateurs de 15 ml (cutoff 5000 Da, Vivaspine). Le mélange concentré est déposé sur une colonne de gel filtration (G50 fine sephadex matrix, GE Healthcare), équilibré avec un tampon (100 mM MES-NaOH (pH 6), 400 mM NaCl, 1 mM TCEP neutre). L'éluat est recueilli par fraction de 2 ml, les fractions contenant les protéines sont identifiées par dosage (méthode de Bradford) et celles contenant la protéine d'intérêt sont identifiées par migration des fractions protéiques sur un gel SDS-PAGE à 17 % d'acrylamide. Les fractions contenant la protéine pure sont rassemblées et à nouveau concentrées dans un concentrateur de 15 ml à 4 °C pour obtenir un volume de 1,5 ml. Le tampon d'élution de la colonne de filtration est remplacé par un tampon de stockage dégazé (40 mM MES-NaOH (pH 6), 400 mM NaCl, 10 % glycérol) via deux filtrations successives sur une colonne Nap10 (GE Healthcare). La solution de protéines est dosée par la méthode de micro-BCA (4.2.1) et l'état rédox des cystéines est vérifié par un dosage au DTNB (4.2.2). La protéine est conservée à -80 °C.

4.2. Dosage des protéines

4.2.1. Dosage des protéines totales

La méthode utilisée est celle mise au point dans le test colorimétrique Bio-Rad DC inspiré de la méthode de Lowry (Lowry et coll. 1951). L'ingéniosité du dosage réside dans deux étapes qui permettent le développement de la coloration. Tout d'abord, les protéines interagissent avec le cuivre dans un milieu alcalin, constitué par la solution de tartrate de cuivre et du réactif de Folin. La réaction est ensuite poursuivie par la réduction du réactif de Folin par les protéines. La présence des tryptophanes et tyrosines, ainsi que dans une moindre mesure celle des cystéines et des histidines, est à l'origine d'une coloration bleutée dont le pic d'absorbance est situé à 750 nm. Une gamme étalon de BSA (Albumine de Sérum Bovin) permet de déterminer la concentration des protéines d'intérêt.

4.2.2. Dosage des cystéines réduites

Le dosage des cystéines réduites a été réalisé à l'aide du réactif d'Ellman ou DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoate)). Le DTNB est une molécule symétrique où deux groupements nitrothiobenzoate sont reliés par un pont disulfure. La réaction avec le groupement thiolate de la cystéine réduite entraîne la liaison d'un des deux groupements avec la cystéine et la libération du deuxième, qui présente un pic d'absorbance à 410 nm. La réaction est réalisée dans un tampon phosphate à pH 8 et en condition dénaturante (100 mM NaH_2PO_4 -NaOH (pH 8), 400 mM NaCl, 500 μM DTNB, 0,1 % p/v SDS) afin de rendre accessibles toutes les cystéines. Nous avons mesuré la DO à 410 nm et calculé la concentration en thiols libres en utilisant $\epsilon = 13\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour coefficient d'extinction molaire du nitrothiobenzoate (Wright et Viola 1998).

4.3. Extraction des protéines totales de levure

L'extraction de protéines totales de levure est réalisée par une lyse alcaline d'après la méthode de C. Volland et coll. (Volland et coll. 1994). Les levures sont mises en culture dans le milieu choisi et l'équivalent de 3 unités de DO sont récoltées en phase exponentielle de croissance. Le culot est repris dans 500 μl de milieu et incubé dans la glace pendant 10 min en

présence de 0,185 N de soude. Les protéines sont précipitées par 5 % de TCA et laissées à 0 °C pendant 10 min. Les protéines précipitées sont récupérées par centrifugation (15000 g, 10 min, 4 °C), les culots sont lavés avec 500 µl de Tris-base 1M (pH 7,5), puis suspendus dans du tampon d'électrophorèse dénaturant, chauffés 5 min à 95 °C pour les protéines solubles ou 15 min à 37 °C pour les protéines membranaires. Un volume de 5 à 10 µl d'extrait brut est suffisant pour un gel d'électrophorèse.

4.4. Séparation des organites sur gradient de sucrose

Le fractionnement cellulaire des organites de levure s'effectue par centrifugation sur un gradient linéaire de sucrose de 20 à 60 %. Les levures contenues dans un volume de 100 ml d'une culture en phase exponentielle de croissance à DO_{600nm} 0.8 sont récoltées par centrifugation (10 min, 5000 g), rincées dans de l'eau distillée et cassées par agitation vigoureuse dans 0,5 ml de STE10 (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, 10 % p/v sucrose, cocktail d'antiprotéases). L'extrait brut est centrifugé (1000 g, 3 min, 4 °C) pour éliminer les débris cellulaires. Environ 600 µl de l'extrait brut ainsi clarifié est déposé sur 11 ml d'un gradient linéaire de sucrose de 20 à 60 % p/v (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, cocktail d'antiprotéases). Après une centrifugation (100000 g, 18 h, 4 °C) dans un rotor SW41Ti (Beckman Coulter), des fractions de 800 µl sont collectées depuis le haut du tube et les protéines sont précipitées par 10 % de TCA. Après une incubation de 1 h dans la glace, puis une centrifugation (13000 g, 45 min, 4 °C), les culots protéiques sont suspendus dans 50 µl de tampon d'échantillon (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 10 % glycérol, 0,4 % SDS, 0,2 mg/ml bleu de bromophénol). Chaque fraction est alors analysée par SDS-PAGE puis transférée sur une membrane de nitrocellulose pour l'immunodétection.

4.5. Préparation de vacuoles de levures entières

De nombreux protocoles ont été mis au point pour isoler les vacuoles de levures intactes. Nous avons choisi celui décrit par (Sarry et coll. 2007) pour l'étude du protéome de la lumière de la vacuole, car ce protocole a été optimisé et fournit strictement des vacuoles pures et entières. Dans ce protocole, les levures contenues dans 2 l d'une culture en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0.8$) sont récoltées par centrifugation (2500 g, 5 min), rincées à l'eau distillée et incubées 20 min à 30 °C sous agitation dans 200 ml d'un tampon 100 mM Tris-HCl (pH 9,4), 10 mM DTT. Après centrifugation (2500 g, 5 min, 10 °C) les

culots sont suspendus dans 100 ml d'un tampon de sphéroplastisation (0,7 M sorbitol, 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM DTT, 0,1 mg/ml lyticase (Sigma)) et incubés 2 h à 30 °C. Après centrifugation (2000 g, 5 min, 10 °C), les culots sont repris dans 48 ml de SOB (0,6 M sorbitol, 10 mM citrate-NaOH (pH 6,8), 1 mM DTT, cocktail d'antiprotéases). Les sphéroplastés sont lysés au Dounce et 8 ml de lysat sont déposés sur un premier gradient.

Le premier gradient a été déposé comme suit:

- première couche : 8 ml de tampon sucrose/ficoll
(0,6 M sucrose, 10 mM citrate-NaOH (pH 6,8), 2,5 % ficoll 400 (Sigma-Aldrich), 1 mM DTT, cocktail d'antiprotéases)
- deuxième couche : 4 ml d'un mélange SOB/SUC suivant un ratio 2 : 1
SUC (0,6 M sucrose, 10 mM citrate-NaOH (pH 6,8), 1 mM DTT, cocktail d'antiprotéases)
- troisième couche : 7 ml d'un mélange SOB/SUC suivant un ratio 3 : 1

Les gradients sont centrifugés 1 h à 24000 rpm dans un rotor SW-28 (Beckman). Les vacuoles sont collectées à l'interface sucrose/ficoll, reprises dans 14 ml de SOB et déposées sur un deuxième gradient. Ce deuxième gradient est composé d'une première couche de 7 ml d'un mélange SOB/SUC 1,5 : 1 et d'une deuxième couche de 7 ml d'un mélange SOB/SUC 2 : 1. Après une nouvelle centrifugation d'une heure, le surnageant est éliminé et les culots sont lavés dans 100 ml de SOB sans DTT, avant d'être repris dans 1 ml de SOB. Les protéines sont dosées par micro-BCA et les échantillons sont conservés à -80 °C.

4.6. Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Les gels sont préparés suivant la méthode de (Laemmli 1970). Les gels sont composés d'un gel de concentration (1,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 4 % acrylamide) et d'un gel de séparation (3 M Tris-NaOH (pH 8,8), 10 à 17 % acrylamide). L'échantillon protéique (50 µg) est préparé dans un tampon de dénaturation (200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 8 % p/v SDS, 40 % glycérol, 5 % v/v β-mercaptoéthanol, 0,004% p/v bleu de bromophénol), puis séparé par électrophorèse (12 W, 50 min) dans un tampon de migration (50 mM Tris-base, 380 mM glycine, 0,1 % p/v SDS). Après la migration, les protéines sont révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie.

4.7. Immunodétection des protéines

Les protéines d'intérêt sont détectées par la technique du « western blotting ». Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,2 μm) selon les protocoles standards (current protocols in molecular biology, Wiley). La membrane est saturée pendant 30 min dans une solution de 2 % p/v de lait écrémé dissout dans du TBS Tween (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % p/v Tween20). Dans ce qui suit, toutes les solutions et incubations sont réalisées dans le TBS Tween. La membrane est rincée rapidement, puis hybridée avec l'anticorps primaire pendant 90 min à la dilution appropriée (Table M.2), la membrane est rincée deux fois pendant 15 min avant d'être incubée avec un anticorps secondaire de souris (GE healthcare) dilué au 1/4000 ou de lapin (Roche Applied Science) dilué au 1/20000, couplé à une activité peroxydase, qui est ensuite détectée par chimiluminescence à l'aide du kit BM Chemiluminescence Western Blotting (Roche Molecular Biochemicals). Pour contrôler la quantité de protéines transférées, la membrane de nitrocellulose est colorée au rouge ponceau.

protéine	anticorps	concentration	dilution	fournisseur
GFP	Monoclonal / Primaire	0,4 mg/ml	1/6000	Roche Applied Science
HA	Monoclonal / Primaire + secondaire	0,1 mg/ml	1/40 000	Roche Applied Science
Vps10	Monoclonal / Primaire	0,5 mg/ml	1/3000	Molecular Probe
Pep12	Monoclonal / Primaire	0,5 mg/ml	1/3000	Molecular Probe
Vma1	Monoclonal / Primaire	0,25 mg/ml	1/10 000	Molecular Probe
Pma1	Polyclonal / Primaire	sérum	1/10 000	Monk et coll. 1991

Table M.2 : récapitulatif des anticorps

5. Spectrométrie

5.1. Détection de la fixation du cuivre sur les groupements thiolates

La fixation du cuivre sur le domaine nucléotidique de Ccc2 a été observée par spectroscopie d'absorption entre 225 et 350 nm avec un spectrophotomètre U-3010 (Hitachi). Le Cu(I) est une espèce très réactive à l'oxygène donc rapidement oxydée en Cu(II). Diverses précautions ont été prises pour limiter l'oxydation du Cu(I) en Cu(II) pendant la durée des expériences, la température de 4 °C et la saturation de l'enceinte du spectrophotomètre avec de l'argon {Miras, 2008 #735}. Enfin le tampon contenait du sulfite, Na_2SO_3 , qui réduit le Cu(II) en

Cu(I) tout en ayant une faible affinité pour le Cu(I). La protéine était diluée dans un tampon 50 mM EPPS-NaOH (pH 8,5), NaCl 400 mM, Na₂SO₃ 1 mM dans une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm. Le cuivre sous la forme CuSO₄ était ajouté progressivement par pas de 0.5 équivalent de protéine sous agitation.

5.2. Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été acquis entre 195 et 250 nm avec un spectropolarimètre Jasco J-810 dans des cuves en quartz de trajet optique 2 mm. Les mêmes précautions ont été prises pour limiter l'oxydation du Cu(I). La concentration de protéine dans ces expériences de caractérisation était de 10-15 µM dans un tampon 50 mM MES-NaOH (pH 6), glycérol 1 %, NaCl 40 mM. Le cuivre sous la forme d'un mélange Cu(II)/Na₂SO₃ était ajouté progressivement par équivalent de protéine. Les spectres obtenus sont le résultat de l'accumulation de 15 enregistrements acquis à la vitesse de 100 nm/min avec un pas de 1 nm. Le signal est l'ellipticité (Θ) qui s'exprime en millidegrés (mdeg). Les spectres sont présentés en ellipticité molaire par résidu ($[\Theta]$) en deg.cm².dmol⁻¹, ce qui permet de les comparer entre eux.

$[\Theta] = 0,1 \Theta / (C.N.l)$ où C est la concentration de protéine en mol.l⁻¹, l est le trajet optique en cm et N est le nombre d'acides aminés de la protéine.

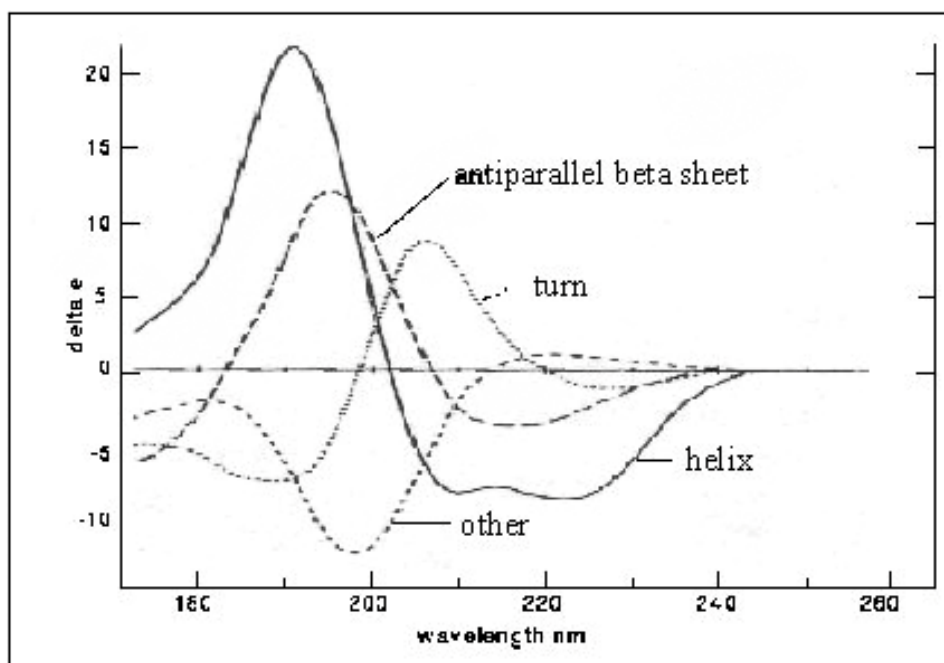


Figure M.2 Spectre de référence des structures secondaires en dichroïsme circulaire

La forme de ces spectres est comparée à la celle de spectres de référence qui montrent les signatures des structures secondaires, hélices α ou feuillets β pour les principales (Figure M.2). Ces spectres permettent de savoir si les protéines étudiées sont structurées et le cas échéant, quelles signatures sont prépondérantes. La fixation d'un métal peut aussi contribuer à la structuration de la protéine ou à un changement de conformation visible dans les structures secondaires.

Perspectives

Les résultats de cette thèse apportent des éléments de réponse aux questions se posant sur le fonctionnement et la régulation des ATPases à cuivre eucaryotes. Mais ils apportent aussi leur lot de questions et ouvrent des pistes nouvelles pour y répondre.

L'analyse de la localisation de Ccc2 montre que cette protéine est un bon modèle d'ATPase à cuivre eucaryote, puisque non seulement elle délivre le cuivre à la voie sécrétoire, mais elle se déplace quand la concentration extracellulaire augmente. Il reste maintenant à exploiter pleinement cet outil. Tout d'abord, nous pourrions rechercher le signal responsable de la sensibilité au cuivre de sa localisation, qu'il soit direct, via la fixation du cuivre dans un site senseur à déterminer ou indirect via la phosphorylation par une kinase sensible au cuivre. Nous pourrions également utiliser la souplesse du modèle levurien pour identifier les protéines partenaires de Ccc2 dans la régulation de sa localisation intracellulaire. En effet, des études par double hybride ont récemment mis en évidence des interactions entre le N-terminal d'ATP7B et la sous-unité 62 de la dynactine, ainsi qu'avec la glutaredoxin 1 (Lim et coll. 2006a & b). Leur inactivation dans la levure permettrait de confirmer le rôle de ces protéines. De plus, l'utilisation du délétome et des mutants thermosensibles permettrait de découvrir de nouvelles protéines participant à cette régulation.

Le dosage du cuivre sur cellule entière de souches *ccc2Δ* exprimant différents mutants de Ccc2 repose la question de l'acquisition du cuivre par l'ATPase. En effet, si le chemin Atx1-MBD-site de transport semble acquis pour une levure soumise à une carence en cuivre et en fer (Morin 2005), ce chemin doit être contourné dans certaines conditions. Par exemple, les mutants M1ssM2ssCcc2 et ΔMBDCcc2 accumulent du cuivre, alors qu'ils n'ont pas de MBD fonctionnels. Nos expériences ayant été menées dans une souche *ccc2Δ*, nous ne pouvons pas exclure un transfert direct du cuivre d'Atx1 à ΔMBDCcc2. Les résultats de Gonzalez-Guerrero et Arguello (2008) obtenus sur CopA d'*A. fulgidus* permettent d'envisager ce scénario. Mais nous pouvons également envisager que Ccc2 acquiert son cuivre par une autre source qu'Atx1, soit une autre chaperonne comme le domaine N-terminal de Ccs dont la structure est la même que celle d'Atx1, ou encore d'un stock intracellulaire non protéique comme le glutathion ou le ligand mis en évidence dans la mitochondrie (Cobine et coll. 2006).

Annexes

Abréviations

ABC : ATP Binding Cassette
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ALP : ALkaline Phosphatase
ALS : Sclérose Latérale Amyotrophique
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN : Acide RiboNucléique
ARS : Autonomously Replicating Sequence
ATP : Adénosine TriPhosphate
BCA : BicinChoninic acid
BCS : BathoCuproine diSulfonate
BSA : Albumine de Sérum Bovin
Cco : Cytochrome c oxydase
CD : Circular Dichroïsme
CEN : CENtromérique
CPY : CarboPeptidase Y
CSM : Complete aminoacids Supplement Mixture
DIC : Differential Interferentiel Contrast
DO : Densité Optique
DOB : Dropout Base Broth
DTNB : 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoate
DTT : DiThioThreitol
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acide
EPSP : 4-(2-hydroxyEthyl)-1-PiperazinePropaneSulfonic acide
GBN : Grande Boucle Nucléotidique
GFP : Green Fluorescent Protein
GSH : Glutathion
HA : HémAgglutinine
HMA : Heavy Metal Associated
ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectra
IPTG : Iso-Propyl b-D-1-ThioGalactopyranoside
LB : Luria Bertani
MBD : Metal Binding Domain
MES : 2-(N-Morpholino)Ethane Sulfonic acide
MVB : MultiVesicular Body
ORF : Open Reading Frame
p/v : poids / volume
PCR : Polymerase Chain Reaction
PKA : Protéine Kinase A
PMSF : Phenyl-Methane Sulfonyl Fluoride
RFP : Red Fluorescent Protein

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : Réactive Oxygen Species
RPE : Résonnance Paramagnétique Electronique
SC : Synthétique Complet
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SOB : SOrbitol Buffer
SOD : Super Oxyde Dismutase
STE : Sucrose Tris-EDTA
SUC : SUCrose Buffer
TBS : Tris-Base Saline
TCA : Acide TriChloroAcétique
TCEP : Tris(2-CarboxyEthyl)phosphine hydrochloride
TGN : TransGolgi Network
TM : TransMembrane
TMAH : TetraMethylAmmonium Hydroxide
UV : UltraViolet
v/v : volume / volume
YNB : Yeast Nitrogen Base
YPD : Yeast Peptone Dextrose

Références

A.

- Abajian C., Yatsunyk L.A., Ramirez B.E. and Rosenzweig A.C. (2004) Yeast cox17 solution structure and Copper(I) binding. *J Biol Chem* 279, 53584-53592
- Achila D., Banci L., Bertini I., Bunce J., Ciofi-Baffoni S. and Huffman D.L. (2006) Structure of human Wilson protein domains 5 and 6 and their interplay with domain 4 and the copper chaperone HAH1 in copper uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5729-5734
- Ackland M.L., Cornish E.J., Paynter J.A., Grimes A., Michalczyk A. and Mercer J.F. (1997) Expression of Menkes disease gene in mammary carcinoma cells. *Biochem J* 328, 237-243.
- Adle D.J., Sinani D., Kim H. and Lee J. (2007) A cadmium-transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282, 947-955
- Aller S.G. and Unger V.M. (2006) Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3627-3632
- Altendorf K., Gassel M., Puppe W., Mollenkamp T., Zeeck A., Boddien C., Fendler K., Bamberg E. and Drose S. (1998) Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. *Acta Physiol Scand Suppl* 643, 137-146
- Ambrosini L. and Mercer J.F. (1999) Defective copper-induced trafficking and localization of the Menkes protein in patients with mild and copper-treated classical Menkes disease. *Hum Mol Genet* 8, 1547-1555.
- Andrés-Colás N., Sancenón V., Rodríguez-Navarro S., Mayo S., Thiele D.J., Ecker J.R., Puig S. and Peñarrubia L. (2006) The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J* 45, 225-236
- Anthonisen A.N., Clausen J.D. and Andersen J.P. (2006) Mutational analysis of the conserved TGES loop of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 281, 31572-31582
- Argüello J.M. (2003) Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol* 195, 93-108
- Argüello J.M., Mandal A.K. and Mana-Capelli S. (2003) Heavy metal transport CPx-ATPases from the thermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Ann N Y Acad Sci* 986, 212-218.
- Argüello J.M., Eren E. and Gonzalez-Guerrero M. (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals* 20, 233-248
- Arnesano F., Banci L., Bertini I., Cantini F., Ciofi-Baffoni S., Huffman D.L. and O'Halloran T.V. (2001a) Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. *J Biol Chem* 276, 41365-41376
- Arnesano F., Banci L., Bertini I., Huffman D.L. and O'Halloran T.V. (2001b) Solution structure of the Cu(I) and apo forms of the yeast metallochaperone, Atx1. *Biochemistry* 40, 1528-1539

- Arnesano F., Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Molteni E., Huffman D.L. and O'Halloran T.V. (2002) Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res* 12, 255-271
- Arredondo M., Muñoz P., Mura C.V. and Nuñez M.T. (2003) DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C1525-1530
- Ashida J., Higashi N. and Kikuchi T. (1963) An Electronmicroscopic Study on Copper Precipitation by Copper-resistant Yeast Cells. *Protoplasma* 57, 27-32
- Askwith C., Eide D., Van Ho A., Bernard P.S., Li L., Davis-Kaplan S., Sipe D.M. and Kaplan J. (1994) The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76, 403-410
- Axelsen K.B. and Palmgren M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 46, 84-101

B.

- Bal N., Mintz E., Guillain F. and Catty P. (2001) A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd²⁺-ATPase. *FEBS Lett* 506, 249-252
- Balatri E., Banci L., Bertini I., Cantini F. and Ciofi-Baffoni S. (2003) Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein Involved in cytochrome c oxidase assembly. *Structure (Camb)* 11, 1431-1443
- Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Huffman D.L. and O'Halloran T.V. (2001) Solution structure of the yeast copper transporter domain Ccc2a in the apo and Cu(I)-loaded states. *J Biol Chem* 276, 8415-8426
- Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Del Conte R. and Gonnelli L. (2003) Understanding copper trafficking in bacteria: interaction between the copper transport protein CopZ and the N-terminal domain of the copper ATPase CopA from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 42, 1939-1949
- Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Su X.C., Borrelly G.P. and Robinson N.J. (2004) Solution structures of a cyanobacterial metallochaperone: insight into an atypical copper binding motif. *J Biol Chem* 279, 27502-27510
- Banci L., Bertini I., Cantini F., Felli I.C., Gonnelli L., Hadjiliadis N., Pierattelli R., Rosato A. and Voulgaris P. (2006) The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. *Nat Chem Biol* 2, 367-368
- Barros M.H., Johnson A. and Tzagoloff A. (2004) COX23, a homologue of COX17, is required for cytochrome oxidase assembly. *J Biol Chem* 279, 31943-31947
- Beard S.J., Hashim R., Membrillo-Hernandez J., Hughes M.N. and Poole R.K. (1997) Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the zntA gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Mol Microbiol* 25, 883-891
- Beeler T.J., Fu D., Rivera J., Monaghan E., Gable K. and Dunn T.M. (1997) SUR1 (CSG1/BCL21), a gene necessary for growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of high Ca²⁺ concentrations at 37 degrees C, is required for mannosylation of inositolphosphorylceramide. *Mol Gen Genet* 255, 570-579

- Berben G., Dumont J., Gilliquet V., Bolle P.A. and Hilger F. (1991) The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 475-477
- Bertinato J., Swist E., Plouffe L.J., Brooks S.P. and L'Abbe M R. (2008) Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells. *Biochem J* 409, 731-740
- Bissig K.D., Wunderli-Ye H., Duda P.W. and Solioz M. (2001) Structure-function analysis of purified *Enterococcus hirae* CopB copper ATPase: effect of Menkes/Wilson disease mutation homologues. *Biochem J* 357, 217-223
- Borremans B., Hobman J.L., Provoost A., Brown N.L. and van Der Lelie D. (2001) Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol* 183, 5651-5658
- Bowers K. and Stevens T.H. (2005) Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1744, 438-454
- Brachmann C.B., Davies A., Cost G.J., Caputo E., Li J., Hieter P. and Boeke J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132
- Brazeau B.J., Johnson B.J. and Wilmot C.M. (2004) Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Arch Biochem Biophys* 428, 22-31
- Brenes-Pomales A., Lindegren G. and Lindegren C.C. (1955) Gene Control of Copper-Sensitivity in *Saccharomyces*. *Nature* 176, 841-842
- Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S. and Karplus M. (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comp Chem* 4, 187-217
- Bull P.C., Thomas G.R., Rommens J.M., Forbes J.R. and Cox D.W. (1993) The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 5, 327-337
- Burstein E., Ganesh L., Dick R.D., Van De Sluis B., Wilkinson J.C., Klomp L.W., Wijmenga C., Brewer G.J., Nabel G.J. and Duckett C.S. (2004) A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *Embo J* 23, 244-254. Epub 2003 Dec 2018.

C.

- Calderone V., Dolderer B., Hartmann H.J., Echner H., Luchinat C., Del Bianco C., Mangani S. and Weser U. (2005) The crystal structure of yeast copper thionein: the solution of a long-lasting enigma. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 51-56
- Camakaris J., Mann J.R. and Danks D.M. (1979) Copper metabolism in mottled mouse mutants: copper concentrations in tissues during development. *Biochem J* 180, 597-604
- Camakaris J., Petris M.J., Bailey L., Shen P., Lockhart P., Glover T.W., Barcroft C., Patton J. and Mercer J.F. (1995) Gene amplification of the Menkes (MNK; ATP7A) P-type

- ATPase gene of CHO cells is associated with copper resistance and enhanced copper efflux. *Hum Mol Genet* 4, 2117-2123.
- Cater M.A., Forbes J., La Fontaine S., Cox D. and Mercer J.F. (2004) Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites. *Biochem J* 380, 805-813
- Cater M.A., La Fontaine S., Shield K., Deal Y. and Mercer J.F. (2006) ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: insight into biliary copper excretion. *Gastroenterology* 130, 493-506
- Cater M.A., La Fontaine S. and Mercer J.F. (2007) Copper binding to the N-terminal metal-binding sites or the CPC motif is not essential for copper-induced trafficking of the human Wilson protein (ATP7B). *Biochem J* 401, 143-153
- Catty P., de Kerchove d'Exaerde A. and Goffeau A. (1997) The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett* 409, 325-332
- Champeil P., Menguy T., Soulie S., Juul B., de Gracia A.G., Rusconi F., Falson P., Denoroy L., Henao F., le Maire M. and Møller J.V. (1998) Characterization of a protease-resistant domain of the cytosolic portion of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Nucleotide- and metal-binding sites. *J Biol Chem* 273, 6619-6631.
- Chelly J. and Monaco A.P. (1993) Cloning the Wilson disease gene. *Nat Genet* 5, 317-318.
- Chelly J., Tumer Z., Tonnesen T., Petterson A., Ishikawa-Brush Y., Tommerup N., Horn N. and Monaco A.P. (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat Genet* 3, 14-19.
- Chintalapati S., Al Kurdi R., van Scheltinga A.C. and Kuhlbrandt W. (2008) Membrane structure of CtrA3, a copper-transporting P-type-ATPase from *Aquifex aeolicus*. *J Mol Biol* 378, 581-595
- Ciriolo M.R., Desideri A., Paci M. and Rotilio G. (1990) Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I).glutathione complex. *J Biol Chem* 265, 11030-11034
- Cobbett C.S. (1999) A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci* 4, 335-337
- Cobbold C., Ponnambalam S., Francis M.J. and Monaco A.P. (2002) Novel membrane traffic steps regulate the exocytosis of the Menkes disease ATPase. *Hum Mol Genet* 11, 2855-2866.
- Cobine P.A., Ojeda L.D., Rigby K.M. and Winge D.R. (2004) Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* 279, 14447-14455
- Cobine P.A., Pierrel F. and Winge D.R. (2006) Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim Biophys Acta* 1763, 759-772
- Cohen A., Nelson H. and Nelson N. (2000) The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J Biol Chem* 275, 33388-33394
- Colangelo E.P. and Guerinot M.L. (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr Opin Plant Biol* 9, 322-330
- Conklin D.S., McMaster J.A., Culbertson M.R. and Kung C. (1992) COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12, 3678-3688

- Culotta V.C., Howard W.R. and Liu X.F. (1994) CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 25295-25302
- Culotta V.C., Klomp L.W., Strain J., Casareno R.L., Krems B. and Gitlin J.D. (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *Journal Of Biological Chemistry* 272, 23469-23472

D.

- Dagert M. and Ehrlich S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6, 23-28
- Dancis A., Roman D.G., Anderson G.J., Hinnebusch A.G. and Klausner R.D. (1992) Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3869-3873
- Dancis A., Yuan D.S., Haile D., Askwith C., Eide D., Moehle C., Kaplan J. and Klausner R.D. (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76, 393-402
- de Bie P., Muller P., Wijmenga C. and Klomp L.W. (2007) Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet* 44, 673-688
- De Freitas J.M., Kim J.H., Poynton H., Su T., Wintz H., Fox T., Holman P., Loguinov A., Keles S., van der Laan M. and Vulpe C. (2004) Exploratory and confirmatory gene expression profiling of *mac1Delta*. *J Biol Chem* 279, 4450-4458
- De Silva D.M., Askwith C.C., Eide D. and Kaplan J. (1995) The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. *J Biol Chem* 270, 1098-1101
- Decottignies A., Goffeau A. (1997) Complete inventory of the yeast ABC protein. *Nat Genet* 15, 137-145.
- Decker H., Schweikardt T., Nillius D., Salzbrunn U., Jaenicke E. and Tuczec F. (2007) Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene* 398, 183-191
- Degand I., Catty P., Talla E., Thines-Sempoux D., de Kerchove d'Exaerde A., Goffeau A. and Ghislain M. (1999) Rabbit sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase replaces yeast PMC1 and PMR1 Ca(2+)-ATPases for cell viability and calcineurin-dependent regulation of calcium tolerance. *Mol Microbiol* 31, 545-556
- DiDonato M., Narindrasorasak S. and Sarkar B. (1999) Expression, purification, and metal binding characteristics of the putative copper binding domain from the Wilson disease copper transporting ATPase (ATP7B). *Adv Exp Med Biol* 448, 165-173
- DiDonato M., Hsu H.F., Narindrasorasak S., Que L., Jr. and Sarkar B. (2000) Copper-induced conformational changes in the N-terminal domain of the Wilson disease copper-transporting ATPase. *Biochemistry* 39, 1890-1896
- DiDonato M., Zhang J., Que L., Jr. and Sarkar B. (2002) Zinc binding to the NH₂-terminal domain of the Wilson disease copper-transporting ATPase: implications for in vivo metal ion-mediated regulation of ATPase activity. *J Biol Chem* 277, 13409-13414

- Dierick H.A., Adam A.N., Escara-Wilke J.F. and Glover T.W. (1997) Immunocytochemical localization of the Menkes copper transport protein (ATP7A) to the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet* 6, 409-416
- Diffels J.F., Seret M.L., Goffeau A. and Baret P.V. (2006) Heavy metal transporters in Hemiascomycete yeasts. *Biochimie* 88, 1639-1649
- Dix D.R., Bridgham J.T., Broderius M.A., Byersdorfer C.A. and Eide D.J. (1994) The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 26092-26099
- Dmitriev O., Tsivkovskii R., Abildgaard F., Morgan C.T., Markley J.L. and Lutsenko S. (2006) Solution structure of the N-domain of Wilson disease protein: distinct nucleotide-binding environment and effects of disease mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 5302-5307

E.

- Efremov R.G., Kosinsky Y.A., Nolde D.E., Tsivkovskii R., Arseniev A.S. and Lutsenko S. (2004) Molecular modelling of the nucleotide-binding domain of Wilson's disease protein: location of the ATP-binding site, domain dynamics and potential effects of the major disease mutations. *Biochem J* 382, 293-305
- Eide D.J., Bridgham J.T., Zhao Z. and Mattoon J.R. (1993) The vacuolar H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Mol Gen Genet* 241, 447-456
- Eide D.J., Clark S., Nair T.M., Gehl M., Gribskov M., Guerinot M.L. and Harper J.F. (2005) Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* 6, R77
- El Meskini R., Culotta V.C., Mains R.E. and Eipper B.A. (2003) Supplying copper to the cuproenzyme peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *J Biol Chem* 278, 12278-12284. Epub 12003 Jan 12214.

F.

- Fagan M.J. and Saier M.H., Jr. (1994) P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J Mol Evol* 38, 57-99
- Feliciello I. and Chinali G. (1993) A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 212, 394-401
- Forbes J.R. and Cox D.W. (1998) Functional characterization of missense mutations in *ATP7B*: Wilson disease mutation or normal variant? *Am J Hum Genet* 63, 1663-1674
- Forbes J.R., Hsi G. and Cox D.W. (1999) Role of the copper-binding domain in the copper transport function of ATP7B, the P-type ATPase defective in Wilson disease. *J Biol Chem* 274, 12408-12413
- Forbes J.R. and Cox D.W. (2000) Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum Mol Genet* 9, 1927-1935.
- Francis M.J., Jones E.E., Levy E.R., Martin R.L., Ponnambalam S. and Monaco A.P. (1999) Identification of a di-leucine motif within the C terminus domain of the Menkes

disease protein that mediates endocytosis from the plasma membrane. *J Cell Sci* 112, 1721-1732.

Freedman J.H., Ciriolo M.R. and Peisach J. (1989) The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem* 264, 5598-5605

Fu D., Beeler T.J. and Dunn T.M. (1995) Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu(2+)-ATPase subfamily. *Yeast* 11, 283-292

G.

Gari E., Piedrafita L., Aldea M. and Herrero E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 837-848

Gaxiola R.A., Yuan D.S., Klausner R.D. and Fink G.R. (1998) The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4046-4050

Ge Z. and Taylor D.E. (1996) *Helicobacter pylori* genes hpcopA and hpcopP constitute a cop operon involved in copper export. *FEMS Microbiol Lett* 145, 181-188

Georgatsou E. and Alexandraki D. (1994) Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14, 3065-3073

Georgatsou E., Mavrogiannis L.A., Fragiadakis G.S. and Alexandraki D. (1997) The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem* 272, 13786-13792

Gharieb M.M. and Gadd G.M. (2004) Role of glutathione in detoxification of metal(loid)s by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* 17, 183-188

Gitschier J., Moffat B., Reilly D., Wood W.I. and Fairbrother W.J. (1998) Solution structure of the fourth metal-binding domain from the Menkes copper-transporting ATPase. *Nat Struct Biol* 5, 47-54.

Glerum D.M., Shtanko A. and Tzagoloff A. (1996) Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 271, 14504-14509

Gonzalez-Guerrero M. and Argüello J.M. (2008) Mechanism of Cu⁺-transporting ATPases: soluble Cu⁺ chaperones directly transfer Cu⁺ to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 5992-5997

Goodyer I.D., Jones E.E., Monaco A.P. and Francis M.J. (1999) Characterization of the Menkes protein copper-binding domains and their role in copper-induced protein relocalization. *Hum Mol Genet* 8, 1473-1478.

Graden J.A. and Winge D.R. (1997) Copper-mediated repression of the activation domain in the yeast Mac1p transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5550-5555

Gray H.B., Malmstrom B.G. and Williams R.J. (2000) Copper coordination in blue proteins. *J Biol Inorg Chem* 5, 551-559

Greenough M., Pase L., Voskoboinik I., Petris M.J., O'Brien A.W. and Camakaris J. (2004) Signals regulating trafficking of Menkes (MNK; ATP7A) copper-translocating P-type ATPase in polarized MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1463-1471

- Grill E., Winnacker E.L. and Zenk M.H. (1985) Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230, 674-676
- Gross C., Kelleher M., Iyer V.R., Brown P.O. and Winge D.R. (2000) Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biol Chem* 275, 32310-32316
- Guo Y., Nyasae L., Braiterman L.T. and Hubbard A.L. (2005) NH₂-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G904-916
- Gupta A., Matsui K., Lo J.F. and Silver S. (1999) Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat Med* 5, 183-188

H.

- Hamer D.H., Thiele D.J. and Lemontt J.E. (1985) Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* 228, 685-690
- Hamza I., Schaefer M., Klomp L.W. and Gitlin J.D. (1999) Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13363-13368
- Hamza I., Prohaska J. and Gitlin J.D. (2003) Essential role for Atox1 in the copper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1215-1220. Epub 2003 Jan 1221.
- Harada M., Kumemura H., Sakisaka S., Shishido S., Taniguchi E., Kawaguchi T., Hanada S., Koga H., Kumashiro R., Ueno T., Suganuma T., Furuta K., Namba M., Sugiyama T. and Sata M. (2003) Wilson disease protein ATP7B is localized in the late endosomes in a polarized human hepatocyte cell line. *Int J Mol Med* 11, 293-298.
- Hardman B., Manuelpillai U., Wallace E.M., van de Waasenburg S., Cater M., Mercer J.F. and Ackland M.L. (2004) Expression and localization of menkes and Wilson copper transporting ATPases in human placenta. *Placenta* 25, 512-517.
- Hardman B., Michalczyk A., Greenough M., Camakaris J., Mercer J. and Ackland L. (2007a) Distinct functional roles for the Menkes and Wilson copper translocating P-type ATPases in human placental cells. *Cell Physiol Biochem* 20, 1073-1084
- Hardman B., Michalczyk A., Greenough M., Camakaris J., Mercer J.F. and Ackland M.L. (2007b) Hormonal regulation of the Menkes and Wilson copper-transporting ATPases in human placental Jeg-3 cells. *Biochem J* 402, 241-250
- Harrison M.D., Jones C.E., Solioz M. and Dameron C.T. (2000) Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci* 25, 29-32.
- Hassett R. and Kosman D.J. (1995) Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270, 128-134
- Hassett R.F., Romeo A.M. and Kosman D.J. (1998) Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Role of dioxygen and Fe. *J Biol Chem* 273, 7628-7636
- Haupt M., Bramkamp M., Coles M., Altendorf K. and Kessler H. (2004) Inter-domain motions of the N-domain of the KdpFABC complex, a P-type ATPase, are not driven by ATP-induced conformational changes. *J Mol Biol* 342, 1547-1558

- Hellman N.E. and Gitlin J.D. (2002) Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 22, 439-458
- Hilge M., Siegal G., Vuister G.W., Guntert P., Gloor S.M. and Abrahams J.P. (2003) ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nat Struct Biol* 10, 468-474
- Hirayama T., Kieber J.J., Hirayama N., Kogan M., Guzman P., Nourizadeh S., Alonso J.M., Dailey W.P., Dancis A. and Ecker J.R. (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* 97, 383-393
- Hornig Y.C., Cobine P.A., Maxfield A.B., Carr H.S. and Winge D.R. (2004) Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem* 279, 35334-35340
- Hou Z.J., Narindrasorasak S., Bhushan B., Sarkar B. and Mitra B. (2001) Functional analysis of chimeric proteins of the Wilson Cu(I)-ATPase (ATP7B) and ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-ATPase from Escherichia coli. *J Biol Chem* 276, 40858-40863
- Huh W.K., Falvo J.V., Gerke L.C., Carroll A.S., Howson R.W., Weissman J.S. and O'Shea E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691
- Huibregtse J.M., Engelke D.R. and Thiele D.J. (1989) Copper-induced binding of cellular factors to yeast metallothionein upstream activation sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 65-69
- Hung I.H., Suzuki M., Yamaguchi Y., Yuan D.S., Klausner R.D. and Gitlin J.D. (1997) Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272, 21461-21466
- Huster D., Hoppert M., Lutsenko S., Zinke J., Lehmann C., Mossner J., Berr F. and Caca K. (2003) Defective cellular localization of mutant ATP7B in Wilson's disease patients and hepatoma cell lines. *Gastroenterology* 124, 335-345
- Huster D. and Lutsenko S. (2003) The distinct roles of the N-terminal copper-binding sites in regulation of catalytic activity of the Wilson's disease protein. *J Biol Chem* 278, 32212-32218

I.

- Iida M., Terada K., Sambongi Y., Wakabayashi T., Miura N., Koyama K., Futai M. and Sugiyama T. (1998) Analysis of functional domains of Wilson disease protein (ATP7B) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs Lett* 428, 281-285
- Ito H., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168
- Iwase T., Nishimura M., Sugimura H., Igarashi H., Ozawa F., Shinmura K., Suzuki M., Tanaka M. and Kino I. (1996) Localization of Menkes gene expression in the mouse brain; its association with neurological manifestations in Menkes model mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 91, 482-488.

J.

- Jencks W.P. (1989) How Does a Calcium Pump Pump Calcium? *J Biol Chem* 264, 18855-18858
- Jensen L.T., Howard W.R., Strain J.J., Winge D.R. and Culotta V.C. (1996) Enhanced effectiveness of copper ion buffering by CUP1 metallothionein compared with CRS5 metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 18514-18519
- Jensen P.Y., Bonander N., Horn N., Tümer Z. and Farver O. (1999) Expression, purification and copper-binding studies of the first metal-binding domain of Menkes protein. *European Journal Of Biochemistry* 264, 890-896
- Jin Y.H., Dunlap P.E., McBride S.J., Al-Refai H., Bushel P.R. and Freedman J.H. (2008) Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet* 4, e1000053
- Jo W.J., Loguinov A., Chang M., Wintz H., Nislow C., Arkin A.P., Giaever G. and Vulpe C.D. (2008) Identification of genes involved in the toxic response of *Saccharomyces cerevisiae* against iron and copper overload by parallel analysis of deletion mutants. *Toxicol Sci* 101, 140-151
- Jungmann J., Reins H.A., Lee J., Romeo A., Hassett R., Kosman D. and Jentsch S. (1993) MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *Embo J* 12, 5051-5056

K.

- Kägi J.H. and Vallee B.L. (1960) The role of zinc in alcohol dehydrogenase. V. The effect of metal-binding agents on the structure of the yeast alcohol dehydrogenase molecule. *J Biol Chem* 235, 3188-3192
- Keilin D. and Mann T. (1940) Some properties of laccase from the latex of lacquer trees. *Nature* 145, 304
- Khalimonchuk O., Ostermann K. and Rodel G. (2005) Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with Cox11p, a protein required for the Cu(B) site formation of cytochrome c oxidase. *Curr Genet* 47, 223-233
- Knight S.A., Labbé S., Kwon L.F., Kosman D.J. and Thiele D.J. (1996) A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev* 10, 1917-1929.
- Ko J.H., Son W., Bae G.Y., Kang J.H., Oh W. and Yoo O.J. (2006) A new hepatocytic isoform of PLZF lacking the BTB domain interacts with ATP7B, the Wilson disease protein, and positively regulates ERK signal transduction. *J Cell Biochem* 99, 719-734
- Kuo Y.M., Gitschier J. and Packman S. (1997) Developmental expression of the mouse mottled and toxic milk genes suggests distinct functions for the Menkes and Wilson disease copper transporters. *Hum Mol Genet* 6, 1043-1049

L.

- La Fontaine S., Firth S.D., Lockhart P.J., Brooks H., Parton R.G., Camakaris J. and Mercer J.F. (1998a) Functional analysis and intracellular localization of the human menkes

- protein (MNK) stably expressed from a cDNA construct in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1). *Hum Mol Genet* 7, 1293-1300.
- La Fontaine S., Theophilos M.B., Firth S.D., Gould R., Parton R.G. and Mercer J.F. (2001) Effect of the toxic milk mutation (tx) on the function and intracellular localization of Wnd, the murine homologue of the Wilson copper ATPase. *Hum Mol Genet* 10, 361-370.
- La Fontaine S.L., Firth S.D., Camakaris J., Englezou A., Theophilos M.B., Petris M.J., Howie M., Lockhart P.J., Greenough M., Brooks H., Reddel R.R. and Mercer J.F. (1998b) Correction of the copper transport defect of Menkes patient fibroblasts by expression of the Menkes and Wilson ATPases. *J Biol Chem* 273, 31375-31380.
- Labbé S., Zhu Z. and Thiele D.J. (1997) Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem* 272, 15951-15958.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Laliberté J. and Labbé S. (2008) [The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast]. *Med Sci (Paris)* 24, 277-283
- Lamb A.L., Wernimont A.K., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. and Rosenzweig A.C. (1999) Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol* 6, 724-729
- Lapinskas P., Ruis H. and Culotta V. (1993) Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* catalase gene expression by copper. *Curr Genet* 24, 388-393
- Larin D., Mekios C., Das K., Ross B., Yang A.S. and Gilliam T.C. (1999) Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p. *J Biol Chem* 274, 28497-28504
- Leary S.C., Kaufman B.A., Pellicchia G., Guercin G.H., Mattman A., Jaksch M. and Shoubridge E.A. (2004) Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet* 13, 1839-1848
- Lebrun M., Audurier A. and Cossart P. (1994) Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to cadA and cadC of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *J Bacteriol* 176, 3040-3048
- Lemmon S.K. and Traub L.M. (2000) Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 12, 457-466
- Li L. and Kaplan J. (1998) Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J Biol Chem* 273, 22181-22187
- Li Z.S., Szczypka M., Lu Y.P., Thiele D.J. and Rea P.A. (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* 271, 6509-6517
- Lim C.M., Cater M.A., Mercer J.F. and La Fontaine S. (2006a) Copper-dependent interaction of dynactin subunit p62 with the N terminus of ATP7B but not ATP7A. *J Biol Chem* 281, 14006-14014

- Lim C.M., Cater M.A., Mercer J.F. and La Fontaine S. (2006b) Copper-dependent interaction of glutaredoxin with the N termini of the copper-ATPases (ATP7A and ATP7B) defective in Menkes and Wilson diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 428-436
- Lin C.M., Crawford B.F. and Kosman D.J. (1993) Distribution of ⁶⁴Cu in *Saccharomyces cerevisiae*: cellular locale and metabolism. *J Gen Microbiol* 139, 1605-1615
- Lin S.J. and Culotta V.C. (1995) The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3784-3788
- Lin S.J., Pufahl R.A., Dancis A., O'Halloran T.V. and Culotta V.C. (1997) A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem* 272, 9215-9220
- Linder M.C., Wooten L., Cerveza P., Cotton S., Shulze R. and Lomeli N. (1998) Copper transport. *Am J Clin Nutr* 67, 965S-971S
- Liu J., Sitaram A. and Burd C.G. (2007) Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase. *Traffic* 8, 1375-1384
- Liu X.F., Supek F., Nelson N. and Culotta V.C. (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *J Biol Chem* 272, 11763-11769
- Longtine M.S., McKenzie A., 3rd, Demarini D.J., Shah N.G., Wach A., Brachat A., Philippsen P. and Pringle J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961
- Lowe J., Vieyra A., Catty P., Guillain F., Mintz E. and Cuillel M. (2004) A mutational study in the transmembrane domain of Ccc2p, the yeast Cu(I)-ATPase, shows different roles for each Cys-Pro-Cys cysteine. *J Biol Chem* 279, 25986-25994
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Lund P.A. and Brown N.L. (1987) Role of the merT and merP gene products of transposon Tn501 in the induction and expression of resistance to mercuric ions. *Gene* 52, 207-214
- Lutsenko S. and Kaplan J.H. (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* 34, 15607-15613
- Lutsenko S., Barnes N.L., Bartee M.Y. and Dmitriev O.Y. (2007) Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 87, 1011-1046
- Lutsenko S., LeShane E.S. and Shinde U. (2007) Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch Biochem Biophys* 463, 134-148

M.

- Machonkin T.E., Zhang H.H., Hedman B., Hodgson K.O. and Solomon E.I. (1998) Spectroscopic and magnetic studies of human ceruloplasmin: identification of a redox-inactive reduced Type 1 copper site. *Biochemistry* 37, 9570-9578

- MacPherson I.S. and Murphy M.E. (2007) Type-2 copper-containing enzymes. *Cell Mol Life Sci* 64, 2887-2899
- Maine G.N. and Burstein E. (2007) COMMD proteins: COMMing to the scene. *Cell Mol Life Sci* 64, 1997-2005
- Mana-Capelli S., Mandal A.K. and Argüello J.M. (2003) Archaeoglobus fulgidus CopB is a thermophilic Cu^{2+} -ATPase. Functional role of its histidine-rich N-terminal metal binding domain. *J Biol Chem* 278, 22
- Mandal A.K., Yang Y., Kertesz T.M. and Argüello J.M. (2004) Identification of the transmembrane metal binding site in Cu^{+} -transporting PIB-type ATPases. *J Biol Chem* 279, 54802-54807
- Mann J.R., Camakaris J. and Danks D.M. (1980) Copper metabolism in mottled mouse mutants. Defective placental transfer of ^{64}Cu to foetal brindled (Mobr) mice. *Biochem J* 186, 629-631
- Maruyama K. and MacLennan D.H. (1988) Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca^{2+} transport activity of the Ca^{2+} -ATPase expressed in COS-1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 3314-3318
- Meister A. and Anderson M.E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760
- Menkes J.H., Alter M., Steigleder G.K., Weakley D.R. and Sung J.H. (1962) A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics* 29, 764-779
- Mercer J.F., Livingston J., Hall B., Paynter J.A., Begy C., Chandrasekharappa S., Lockhart P., Grimes A., Bhawe M., Siemieniak D. and et al. (1993) Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet* 3, 20-25.
- Mercer J.F., Barnes N., Stevenson J., Strausak D. and Llanos R.M. (2003) Copper-induced trafficking of the cU-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis. *Biometals* 16, 175-184
- Michalczyk A.A., Rieger J., Allen K.J., Mercer J.F. and Ackland M.L. (2000) Defective localization of the Wilson disease protein (ATP7B) in the mammary gland of the toxic milk mouse and the effects of copper supplementation. *Biochem J* 352 Pt 2, 565-571.
- Miras R., Morin I., Jacquin O., Cuillel M., Guillain F. and Mintz E. (2008) Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1. *J Biol Inorg Chem* 13, 195-205
- Møller J.V., Juul B. and le Maire M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1286, 1-51
- Møller J.V., Nissen P., Sørensen T.L. and le Maire M. (2005) Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump. *Curr Opin Struct Biol* 15, 387-393
- Monty J.F., Llanos R.M., Mercer J.F. and Kramer D.R. (2005) Copper exposure induces trafficking of the menkes protein in intestinal epithelium of ATP7A transgenic mice. *J Nutr* 135, 2762-2766
- Morgan C.T., Tsivkovskii R., Kosinsky Y.A., Efremov R.G. and Lutsenko S. (2004) The distinct functional properties of the nucleotide-binding domain of ATP7B, the human Copper-transporting ATPase. Analysis of the wilson disease mutations E1064A, H1069Q, R1151H, and C1104F. *J Biol Chem* 279, 36363-36371

- Morin I. (2005). Convoyage et transfert du cuivre(I) à l'appareil de Golgi dans *Saccharomyces cerevisiae* : Rôle de la métallo-chaperonne Atx1 et de l'ATPase Ccc2. Doctorat de l'Université Joseph Fourier, 29 novembre 2005, Grenoble.
- Morin I., Cuillel M., Lowe J., Crouzy S., Guillain F. and Mintz E. (2005) Cd^{2+} - or Hg^{2+} -binding proteins can replace the Cu^+ -chaperone Atx1 in delivering Cu^+ to the secretory pathway in yeast. *FEBS Lett* 579, 1117-1123
- Morin I., Gudín S., Mintz E. and Cuillel M. (2008) *Molecular Microbiology*
- Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S., Sorensen T.L., Petersen J., Andersen J.P., Vilsen B. and Nissen P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450, 1043-1049
- Mufti A.R., Burstein E., Csomos R.A., Graf P.C., Wilkinson J.C., Dick R.D., Challa M., Son J.K., Bratton S.B., Su G.L., Brewer G.J., Jakob U. and Duckett C.S. (2006) XIAP Is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders. *Mol Cell* 21, 775-785
- Musci G., Di Marco S., Bellenchi G.C. and Calabrese L. (1996) Reconstitution of ceruloplasmin by the Cu(I)-glutathione complex. Evidence for a role of Mg^{2+} and ATP. *J Biol Chem* 271, 1972-1978

N.

- Nakamura K. and Go N. (2005) Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell Mol Life Sci* 62, 2050-2066
- Nishihara E., Furuyama T., Yamashita S. and Mori N. (1998) Expression of copper trafficking genes in the mouse brain. *Neuroreport* 9, 3259-3263
- Nobrega M.P., Bandeira S.C., Beers J. and Tzagoloff A. (2002) Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 277, 40206-40211
- Nose Y., Kim B.E. and Thiele D.J. (2006a) Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function. *Cell Metab* 4, 235-244
- Nose Y., Rees E.M. and Thiele D.J. (2006b) Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends Biochem Sci* 31, 604-607
- Nucifora G., Chu L., Misra T.K. and Silver S. (1989) Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 cadA gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 3544-3548
- Novick P. and Schekman R. (1979) Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 1858-1862
- Novick P., Field C. and Schekman R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215
- Nyasae L., Bustos R., Braiterman L., Eipper B. and Hubbard A. (2007) Dynamics of Endogenous Atp7a (Menkes Protein) in Intestinal Epithelial Cells: Copper-Dependent Redistribution between Two Intracellular Sites. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1181-1194

O.

- Odermatt A., Suter H., Krapf R. and Solioz M. (1992) An ATPase operon involved in copper resistance by *Enterococcus hirae*. *Ann N Y Acad Sci* 671, 484-486.
- Odermatt A., Suter H., Krapf R. and Solioz M. (1993) Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* 268, 12775-12779.
- Odermatt A., Krapf R. and Solioz M. (1994) Induction of the putative copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag^+ and Cu^+ , and Ag^+ extrusion by CopB. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 44-48
- Okkeri J. and Haltia T. (1999) Expression and mutagenesis of ZntA, a zinc-transporting P-type ATPase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 14109-14116.
- Ooi C.E., Rabinovich E., Dancis A., Bonifacino J.S. and Klausner R.D. (1996) Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *Embo J* 15, 3515-3523.

P.

- Pascale M.C., Franceschelli S., Moltedo O., Belleudi F., Torrisi M.R., Bucci C., La Fontaine S., Mercer J.F. and Leone A. (2003) Endosomal trafficking of the Menkes copper ATPase ATP7A is mediated by vesicles containing the Rab7 and Rab5 GTPase proteins. *Exp Cell Res* 291, 377-385.
- Pase L., Voskoboinik I., Greenough M. and Camakaris J. (2004) Copper stimulates trafficking of a distinct pool of the Menkes copper ATPase (ATP7A) to the plasma membrane and diverts it into a rapid recycling pool. *Biochem J* 378, 1031-1037
- Payne A.S. and Gitlin J.D. (1998) Functional expression of the Menkes disease protein reveals common biochemical mechanisms among the copper-transporting P-type ATPases. *J Biol Chem* 273, 3765-3770
- Pearce D.A. and Sherman F. (1999) Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181, 4774-4779
- Pearson R.G. (1963) Physical and inorganic chemistry, hard and soft acids and bases. *J Am Chem Soc* 85, 3533-3539
- Pedersen B.P., Buch-Pedersen M.J., Morth J.P., Palmgren M.G. and Nissen P. (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450, 1111-1114
- Peña M.M., Puig S. and Thiele D.J. (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* 275, 33244-33251
- Petris M.J., Mercer J.F., Culvenor J.G., Lockhart P., Gleeson P.A. and Camakaris J. (1996) Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *Embo J* 15, 6084-6095

- Petris M.J. and Mercer J.F. (1999) The Menkes protein (ATP7A; MNK) cycles via the plasma membrane both in basal and elevated extracellular copper using a C-terminal dileucine endocytic signal. *Hum Mol Genet* 8, 2107-2115.
- Petris M.J., Voskoboinik I., Cater M., Smith K., Kim B.E., Llanos R.M., Strausak D., Camakaris J. and Mercer J.F. (2002) Copper-regulated trafficking of the Menkes disease copper ATPase is associated with formation of a phosphorylated catalytic intermediate. *J Biol Chem* 277, 46736-46742
- Petrukhin K., Fischer S.G., Pirastu M., Tanzi R.E., Chernov I., Devoto M., Brzustowicz L.M., Cayanis E., Vitale E., Russo J.J. and et al. (1993) Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet* 5, 338-343.
- Piper R.C., Bryant N.J. and Stevens T.H. (1997) The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J Cell Biol* 138, 531-545
- Portnoy M.E., Rosenzweig A.C., Rae T., Huffman D.L., O'Halloran T.V. and Culotta V.C. (1999) Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone. *J Biol Chem* 274, 15041-15045
- Portnoy M.E., Liu X.F. and Culotta V.C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol Cell Biol* 20, 7893-7902
- Portnoy M.E., Schmidt P.J., Rogers R.S. and Culotta V.C. (2001) Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 265, 873-882
- Pufahl R.A., Singer C.P., Peariso K.L., Lin S.J., Schmidt P.J., Fahrni C.J., Culotta V.C., Penner-Hahn J.E. and O'Halloran T.V. (1997) Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* 278, 853-856

Q.

- Qi M. and Byers P.H. (1998) Constitutive skipping of alternatively spliced exon 10 in the ATP7A gene abolishes Golgi localization of the menkes protein and produces the occipital horn syndrome. *Hum Mol Genet* 7, 465-469.
- Qian Y., Tiffany-Castiglioni E., Welsh J. and Harris E.D. (1998) Copper efflux from murine microvascular cells requires expression of the menkes disease Cu-ATPase. *J Nutr* 128, 1276-1282.

R.

- Rad M.R., Kirchrath L. and Hollenberg C.P. (1994) A putative P-type Cu(2+)-transporting ATPase gene on chromosome II of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1217-1225
- Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C. and O'Halloran T.V. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284, 805-808

- Rees E.M., Lee J. and Thiele D.J. (2004) Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. *J Biol Chem* 279, 54221-54229
- Rees E.M. and Thiele D.J. (2007) Identification of a vacuole-associated metalloredutase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. *J Biol Chem* 282, 21629-21638
- Rensing C., Ghosh M. and Rosen B.P. (1999) Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* 181, 5891-5897
- Rensing C., Fan B., Sharma R., Mitra B. and Rosen B.P. (2000) CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 652-656
- Roelofsen H., Wolters H., Van Luyn M.J., Miura N., Kuipers F. and Vonk R.J. (2000) Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology* 119, 782-793
- Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X. and et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62
- Rosenzweig A.C., Huffman D.L., Hou M.Y., Wernimont A.K., Pufahl R.A. and O'Halloran T.V. (1999) Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure Fold Des* 7, 605-617
- Rousselot-Pailley P., Seneque O., Lebrun C., Crouzy S., Boturyn D., Dumy P., Ferrand M. and Delangle P. (2006) Model peptides based on the binding loop of the copper metallochaperone Atx1: selectivity of the consensus sequence MxCxxC for metal ions Hg(II), Cu(I), Cd(II), Pb(II), and Zn(II). *Inorg Chem* 45, 5510-5520
- Rutherford J.C., Cavet J.S. and Robinson N.J. (1999) Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *J Biol Chem* 274, 25827-25832

S.

- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354
- Sakurai T. and Kataoka K. (2007) Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cell Mol Life Sci* 64, 2642-2656
- Sali A. and Blundell T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234, 779-815
- Sarkar B. (1995) Metal replacement in DNA-binding zinc finger proteins and its relevance to mutagenicity and carcinogenicity through free radical generation. *Nutrition* 11, 646-649
- Sarrry J.E., Chen S., Collum R.P., Liang S., Peng M., Lang A., Naumann B., Dzierszinski F., Yuan C.X., Hippler M. and Rea P.A. (2007) Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs J* 274, 4287-4305

- Sazinsky M.H., Mandal A.K., Arguello J.M. and Rosenzweig A.C. (2006) Structure of the ATP binding domain from the Archaeoglobus fulgidus Cu⁺-ATPase. *J Biol Chem* 281, 11161-11166
- Schaefer M., Roelofsen H., Wolters H., Hofmann W.J., Muller M., Kuipers F., Stremmel W. and Vonk R.J. (1999) Localization of the Wilson's disease protein in human liver. *Gastroenterology* 117, 1380-1385
- Schmidt P.J., Rae T.D., Pufahl R.A., Hamma T., Strain J., O'Halloran T.V. and Culotta V.C. (1999) Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 274, 23719-23725
- Seigneurin-Berny D., Gravot A., Auroy P., Mazard C., Kraut A., Finazzi G., Grunwald D., Rappaport F., Vavasseur A., Joyard J., Richaud P. and Rolland N. (2006) HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J Biol Chem* 281, 2882-2892
- Sénèque O., Crouzy S., Boturyn D., Dumy P., Ferrand M. and Delangle P. (2004) Novel model peptide for Atx1-like metallochaperones. *Chem Commun (Camb)*, 770-771
- Serrano R., Ruiz A., Bernal D., Chambers J.R. and Arino J. (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Molecular Microbiology* 46, 1319-1333
- Setty S.R., Tenza D., Sviderskaya E.V., Bennett D.C., Raposo G. and Marks M.S. (2008) Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature* 454, 1142-1146
- Shah A.B., Chernov I., Zhang H.T., Ross B.M., Das K., Lutsenko S., Parano E., Pavone L., Evgrafov O., Ivanova-Smolenskaya I.A., Anneren G., Westermarck K., Urrutia F.H., Penschaszadeh G.K., Sternlieb I., Scheinberg I.H., Gilliam T.C. and Petrukhin K. (1997) Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet* 61, 317-328.
- Shi X., Stoj C., Romeo A., Kosman D.J. and Zhu Z. (2003) Fre1p Cu²⁺ reduction and Fet3p Cu¹⁺ oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 50309-50315
- Shikanai T., Muller-Moule P., Munekage Y., Niyogi K.K. and Pilon M. (2003) PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* 15, 1333-1346
- Sikorski R.S. and Hieter P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27
- Singh A., Severance S., Kaur N., Wiltsie W. and Kosman D.J. (2006) Assembly, activation, and trafficking of the Fet3p.Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281, 13355-13364
- Skou J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 23, 394-401
- Solomon E.I., Hare J.W. and Gray H.B. (1976) Spectroscopic studies and a structural model for blue copper centers in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1389-1393

- Stearman R., Yuan D.S., Yamaguchi-Iwai Y., Klausner R.D. and Dancis A. (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271, 1552-1557
- Stephenson S.E., Dubach D., Lim C.M., Mercer J.F. and La Fontaine S. (2005) A single PDZ domain protein interacts with the Menkes copper ATPase, ATP7A. A new protein implicated in copper homeostasis. *J Biol Chem* 280, 33270-33279
- Stevenson T.C., Ciccotosto G.D., Ma X.M., Mueller G.P., Mains R.E. and Eipper B.A. (2003) Menkes protein contributes to the function of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *Endocrinology* 144, 188-200.
- Stohs S.J. and Bagchi D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18, 321-336
- Strausak D., La Fontaine S., Hill J., Firth S.D., Lockhart P.J. and Mercer J.F. (1999) The role of GMXCXXC metal binding sites in the copper-induced redistribution of the Menkes protein. *J Biol Chem* 274, 11170-11177.
- Strausak D., Howie M.K., Firth S.D., Schlicksupp A., Pipkorn R., Multhaup G. and Mercer J.F. (2003) Kinetic analysis of the interaction of the copper chaperone Atox1 with the metal binding sites of the Menkes protein. *J Biol Chem* 278, 20821-20827. Epub 22003 Apr 20824.
- Swain E., Baudry K., Stuke J., McDonough V., Germann M. and Nickels J.T., Jr. (2002) Sterol-dependent regulation of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277, 26177-26184.
- Szczyпка M.S. and Thiele D.J. (1989) A cysteine-rich nuclear protein activates yeast metallothionein gene transcription. *Mol Cell Biol* 9, 421-429
- Szczyпка M.S., Wemmie J.A., Moye-Rowley W.S. and Thiele D.J. (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* 269, 22853-22857
- Szczyпка M.S., Zhu Z., Silar P. and Thiele D.J. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in vacuole function are defective in copper detoxification and iron-responsive gene transcription. *Yeast* 13, 1423-1435

T.

- Tabata K., Kashiwagi S., Mori H., Ueguchi C. and Mizuno T. (1997) Cloning of a cDNA encoding a putative metal-transporting P-type ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1326, 1-6
- Tang X., Halleck M.S., Schlegel R.A. and Williamson P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272, 1495-1497
- Tanzi R.E., Petrukhin K., Chernov I., Pellequer J.L., Wasco W., Ross B., Romano D.M., Parano E., Pavone L., Brzustowicz L.M. and et al. (1993) The Wilson disease gene is

- a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 5, 344-350.
- Tao T.Y., Liu F., Klomp L., Wijmenga C. and Gitlin J.D. (2003) The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein. *J Biol Chem* 278, 41593-41596
- Terada K., Aiba N., Yang X.L., Iida M., Nakai M., Miura N. and Sugiyama T. (1999) Biliary excretion of copper in LEC rat after introduction of copper transporting P-type ATPase, ATP7B. *FEBS Lett*, 53-60
- Thiele D.J. (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol* 8, 2745-2752
- Tottey S., Rich P.R., Rondet S.A. and Robinson N.J. (2001) Two Menkes-type atpases supply copper for photosynthesis in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* 276, 19999-20004
- Toyoshima C. (2000) Structure determination of tubular crystals of membrane proteins. I. Indexing of diffraction patterns. *Ultramicroscopy* 84, 1-14
- Toyoshima C., Nomura H. and Tsuda T. (2004) Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* 432, 361-368
- Tsvikovskii R., MacArthur B.C. and Lutsenko S. (2001) The Lys1010-Lys1325 fragment of the Wilson's disease protein binds nucleotides and interacts with the N-terminal domain of this protein in a copper-dependent manner. *J Biol Chem* 276, 2234-2242
- Tsvikovskii R., Eisses J.F., Kaplan J.H. and Lutsenko S. (2002) Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells. *J Biol Chem* 277, 976-983

V.

- Valko M., Morris H. and Cronin M.T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12, 1161-1208
- Valverde R.H., Morin I., Lowe J., Mintz E., Cuillel M. and Vieyra A. (2008) Cyclic AMP-dependent protein kinase controls energy interconversion during the catalytic cycle of the yeast copper-ATPase. *FEBS Lett* 582, 891-895
- van Bakel H., Strengman E., Wijmenga C. and Holstege F.C. (2005) Gene expression profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism. *Physiol Genomics* 22, 356-367
- van De Sluis B., Rothuizen J., Pearson P.L., van Oost B.A. and Wijmenga C. (2002) Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Hum Mol Genet* 11, 165-173.
- van Dongen E.M., Klomp L.W. and Merks M. (2004) Copper-dependent protein-protein interactions studied by yeast two-hybrid analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 789-795
- van Wassenae-van Hall H.N., van den Heuvel A.G., Algra A., Hoogenraad T.U. and Mali W.P. (1996) Wilson disease: findings at MR imaging and CT of the brain with clinical correlation. *Radiology* 198, 531-536.

- Vanderwerf S.M., Cooper M.J., Stetsenko I.V. and Lutsenko S. (2001) Copper specifically regulates intracellular phosphorylation of the Wilson's disease protein, a human copper-transporting ATPase. *J Biol Chem* 276, 36289-36294
- Volland C., Galan J.M., Urban-Grimal D., Devilliers G. and Haguenaer-Tsapis R. (1994) Endocytose and degradation of the uracil permease of *S. cerevisiae* under stress conditions: possible role of ubiquitin. *Folia Microbiol (Praha)* 39, 554-557
- Voskoboinik I., Brooks H., Smith S., Shen P. and Camakaris J. (1998) ATP-dependent copper transport by the Menkes protein in membrane vesicles isolated from cultured Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett* 435, 178-182
- Voskoboinik I., Strausak D., Greenough M., Brooks H., Petris M., Smith S., Mercer J.F. and Camakaris J. (1999) Functional analysis of the N-terminal CXXC metal-binding motifs in the human menkes copper-transporting P-type ATPase expressed in cultured mammalian cells. *J Biol Chem* 274, 22008-22012
- Voskoboinik I., Greenough M., La Fontaine S., Mercer J.F. and Camakaris J. (2001a) Functional studies on the Wilson copper P-type ATPase and toxic milk mouse mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 966-970.
- Voskoboinik I., Mar J., Strausak D. and Camakaris J. (2001b) The regulation of catalytic activity of the Menkes copper-translocating P-type ATPase. Role of high affinity copper-binding sites. *J Biol Chem* 276, 28620-28627
- Voskoboinik I., Fernando R., Veldhuis N., Hannan K.M., Marmy-Conus N., Pearson R.B. and Camakaris J. (2003a) Protein kinase-dependent phosphorylation of the Menkes copper P-type ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 337-342.
- Voskoboinik I., Mar J. and Camakaris J. (2003b) Mutational analysis of the Menkes copper P-type ATPase (ATP7A). *Biochem Biophys Res Commun* 301, 488-494.
- Vulpe C., Levinson B., Whitney S., Packman S. and Gitschier J. (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* 3, 7-13

W.

- Walker J.M., Tsivkovskii R. and Lutsenko S. (2002) Metallochaperone Atox1 Transfers Copper to the NH2-terminal Domain of the Wilson's Disease Protein and Regulates Its Catalytic Activity. *J Biol Chem* 277, 27953-27959
- Walker J.M., Huster D., Ralle M., Morgan C.T., Blackburn N.J. and Lutsenko S. (2004) The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's Disease Protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1. *J Biol Chem* 279, 15376-15384
- Weissman Z., Berdicevsky I., Cavari B.Z. and Kornitzer D. (2000) The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3520-3525
- Weissman Z., Shemer R. and Kornitzer D. (2002) Deletion of the copper transporter CaCCC2 reveals two distinct pathways for iron acquisition in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 44, 1551-1560.

- Wemmie J.A., Szczypka M.S., Thiele D.J. and Moye-Rowley W.S. (1994) Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *J Biol Chem* 269, 32592-32597
- Westwater J., McLaren N.F., Dormer U.H. and Jamieson D.J. (2002) The adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to mercury exposure. *Yeast* 19, 233-239
- Williams L.E. and Mills R.F. (2005) P(1B)-ATPases--an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* 10, 491-502
- Wilson S.A.K. (1912) Progressive lenticular degeneration : a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 34, 295-507
- Winge D.R., Nielson K.B., Gray W.R. and Hamer D.H. (1985) Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J Biol Chem* 260, 14464-14470
- Wright S.K. and Viola R.E. (1998) Evaluation of methods for the quantitation of cysteines in proteins. *Anal Biochem* 265, 8-14
- Wu C.C., Rice W.J. and Stokes D.L. (2008) Structure of a copper pump suggests a regulatory role for its metal-binding domain. *Structure* 16, 976-985

X.

- Xiao Z. and Wedd A.G. (2002) A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(I) with the copper chaperone Atx1. *Chem Commun*, 588-589
- Xiao Z., Loughlin F., George G.N., Howlett G.J. and Wedd A.G. (2004) C-terminal domain of the membrane copper transporter Ctr1 from *Saccharomyces cerevisiae* binds four Cu(I) ions as a cuprous-thiolate polynuclear cluster: sub-femtomolar Cu(I) affinity of three proteins involved in copper trafficking. *J Am Chem Soc* 126, 3081-3090

Y.

- Yamaguchi-Iwai Y., Stearman R., Dancis A. and Klausner R.D. (1996) Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *Embo J* 15, 3377-3384
- Yamaguchi-Iwai Y., Serpe M., Haile D., Yang W., Kosman D.J., Klausner R.D. and Dancis A. (1997) Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J Biol Chem* 272, 17711-17718.
- Yamaguchi Y., Heiny M.E. and Gitlin J.D. (1993) Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun* 197, 271-277.
- Yamaguchi Y., Heiny M.E., Suzuki M. and Gitlin J.D. (1996) Biochemical characterization and intracellular localization of the Menkes disease protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14030-14035.
- Yang X.L., Miura N., Kawarada Y., Terada K., Petrukhin K., Gilliam T. and Sugiyama T. (1997) Two forms of Wilson disease protein produced by alternative splicing are localized in distinct cellular compartments. *Biochem J* 326, 897-902.

- Yu W., Farrell R.A., Stillman D.J. and Winge D.R. (1996) Identification of SLF1 as a new copper homeostasis gene involved in copper sulfide mineralization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 2464-2472
- Yuan D.S., Stearman R., Dancis A., Dunn T., Beeler T. and Klausner R.D. (1995) The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 2632-2636
- Yuan D.S., Dancis A. and Klausner R.D. (1997) Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J Biol Chem* 272, 25787-25793

Z.

- Zhou B. and Gitschier J. (1997) hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7481-7486.
- Zhu Z., Labbé S., Peña M.M. and Thiele D.J. (1998) Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J Biol Chem* 273, 1277-1280